



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

ALBERTO YOICHI SAKAGUCHI

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS rs1800468 E
rs1800469 E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TGFB1 NA
LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA INFANTOJUVENIL**

Londrina
2017

ALBERTO YOICHI SAKAGUCHI

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS rs1800468 E
rs1800469 E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TGFB1 NA
LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA INFANTOJUVENIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Angelica Ebara Watanabe.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marla Karine Amarante.

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Sakaguchi, Alberto Yoichi .

Análise dos polimorfismos genéticos rs1800468 e rs1800469 e níveis plasmáticos de TGF β 1 na leucemia linfóide aguda infantojuvenil / Alberto Yoichi Sakaguchi. - Londrina, 2017.

68 f. : il.

Orientador: Maria Angelica Ehara Watanabe.

Coorientador: Marla Karine Amarante.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Leucemia linfóide - Tese. 2. Polimorfismo (Genética) - Tese. 3. Citocinas - Tese. 4. Câncer (Aspectos genéticos) - Tese. I. Watanabe, Maria Angelica Ehara. II. Amarante, Marla Karine . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

ALBERTO YOICHI SAKAGUCHI

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS rs1800468 E
rs1800469 E NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TGFB1 NA LEUCEMIA
LINFOIDE AGUDA INFANTOJUVENIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Angelica Ehara
Watanabe
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Carolina Batista Ariza
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 14 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda a força divina que tem fornecido com o decorrer do caminho e por seu amor e bênção infinita. Agradeço a Senhor por sempre estar iluminando e guiando no caminho certo, justo e propício.

Aos meus pais Mario Yukio Sakaguchi e Angela Saito Sakaguchi que sempre apoiaram e confiaram nas minhas conquistas desde sempre presentes na minha vida. Agradeço todos os dias pela educação, paciência e esforço imensuráveis. Agradeço também a minha irmã Ágatha Aki Sakaguchi pelo companheirismo, carinho e amizade.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Maria Angelica Ehara Watanabe pela orientação, credibilidade e aceito como aluno de mestrado e doutorado, e membro do Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismos de DNA (LEAP-DNA). Toda a sua sabedoria sempre será acolhida com muito amor, carinho e admiração. Muito obrigado pelas discussões e oportunidades.

À minha co-orientadora Prof^a Dr^a Marla Karine Amarante pelo ensinamento e paciência. A sua disposição foi muito essencial e imprescindível para conclusão deste trabalho. Muito obrigado pelos conselhos e amizade.

Aos professores Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira e Dr^a Carolina Batista Ariza pelo comprometimento em aprimorar o trabalho, pelas discussões, reflexões e contribuições. Obrigado por participar na evolução e experiência.

À minha amiga Cintya Mayumi Ishibashi que especialmente me acompanhou desde a jornada da graduação até nesta fase final deste trabalho. Sempre carregarei com muita gratificação a nossa amizade, parceria com trabalho e discussões, presença e colaboração.

Aos amigos e parceiros do laboratório, Bruna Karina Banin-Hirata, Diego Lima Petenuci, Glauco Akelington Freire Vitiello, Marcos Henrique Rosa, Mayara Tiemi Enokida, Nathalia de Sousa Pereira, Roberta Losi Guembarovski, Thiago Cezar

Fujita e Vânia Darc de Castro, por aceitarem como membro da família científica, inúmeras contribuições e convivência.

Ao médico onco-hematologista Fausto Celso Trigo pela disponibilidade, dedicação e colaboração com as amostras biológicas para execução deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina pelo conhecimento compartilhado e pela formação acadêmica e científica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa durante o período de mestrado.

A todos os voluntários que participaram deste projeto, especialmente os pacientes do Hospital Universitário e do Hospital do Câncer de Londrina.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

SAKAGUCHI, A. Y. **Análise dos polimorfismos genéticos rs1800468 e rs1800469 e níveis plasmáticos de TGFB1 na leucemia linfóide aguda infantojuvenil.** 2017. 68 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é um tipo de neoplasia hematológica que afeta as células precursoras das linhagens B e T, com maior incidência na faixa pediátrica. Sua fisiopatologia envolve o bloqueio da diferenciação e a elevada proliferação das células precursoras, denominadas blastos leucêmicos. Apesar do desconhecimento, acredita-se que a leucemogênese origine-se de uma complexa interação entre fatores ambientais e genéticos que propicia as modificações celulares. Na LLA, vários estudos de análises genéticas, como polimorfismos de base única (SNPs), têm sido realizados na tentativa de encontrar marcadores que possam estar relacionados com a susceptibilidade a doença ou influenciar a resposta à quimioterapia. O fator de crescimento transformador B1 (TGFB1) é uma citocina pleiotrópica capaz de exercer várias funções biológicas, como moduladora do sistema imune e reguladora da proliferação de células epiteliais e hematológicas. No contexto patológico e carcinogênico, esta citocina pode favorecer a invasão e provocar metástase por meio da modulação do sistema imune e microambiente tumoral. O gene que codifica a citocina TGFB1 apresenta dois polimorfismos na região promotora, rs1800468 (G-800A) e rs1800469 (C-509T), os quais vêm se destacando como possíveis marcadores associados ao câncer e outras doenças. Neste estudo, objetivou-se avaliar estes polimorfismos e os níveis plasmáticos de TGFB1, e determinar sua associação com a susceptibilidade e o prognóstico em pacientes infantojuvenis com LLA. A análise dos polimorfismos genéticos foi realizada pelo método de reação em cadeia da polimerase seguido de avaliação do tamanho dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP), e os níveis plasmáticos de TGFB1 foram quantificados por ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA). Não foram observadas associações entre os dois polimorfismos (rs1800468 e rs1800469) com susceptibilidade ou risco de recidiva da LLA ($p > 0,05$). Na análise de expressão proteica, os polimorfismos da região promotora não foram associados às alterações da concentração plasmática do TGFB1. No entanto, pacientes com LLA apresentaram concentração média de TGFB1 significativamente reduzida em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$). A quimioterapia parece exercer influência na modulação da concentração plasmática desta citocina. Ao diagnóstico, os pacientes com LLA apresentaram níveis plasmáticos significativamente menores quando comparados aos pacientes em tratamento ($p = 0,008$) e em remissão ($p = 0,002$). Além disso, a concentração de TGFB1 plasmático nos pacientes foi restaurada durante a remissão, sendo similar ao grupo controle ($p = 0,95$). Portanto, este estudo demonstra os efeitos de uma função imune desregulada na LLA infantojuvenil, no que se refere ao TGFB1, e indica uma possível regulação do TGFB1 induzida pelo tratamento na LLA.

Palavras-chave: Leucemia linfóide aguda. TGFB1. Polimorfismo genético. ELISA. Quimioterapia.

SAKAGUCHI, A. Y. **Analysis of rs1800468 and rs1800469 genetic polymorphisms and TGFB1 plasma levels in childhood acute lymphoblastic leukemia**. 2017. 68 p. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a type of hematologic malignancy which affects precursor cells of B and T lineages, with higher incidence in childhood. Its pathophysiology involves blockage of differentiation and elevated proliferation of precursor cells, denominated leukemic blasts. In spite of unfamiliarity, it is believed that leukemogenesis results from complex intercommunication between environmental and genetic factors which propitiate cell modifications. In ALL, several studies of genetic analyses, such as single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been realized in attempt to search for markers that could be related with susceptibility to disease or influence in chemotherapy response. The transforming growth factor B1 (TGFB1) is a pleotropic cytokine able to exert biological functions, like immunomodulation and regulator of cell proliferation of epithelial and hematologic cells. In pathologic and carcinogenic context, this cytokine can promote invasion and induce metastasis through immunomodulation and tumor microenvironment. The gene that codifies TGFB1 cytokine presents two polymorphisms in promoter region, rs1800468 (G-800A) and rs1800469 (C-509T), in which have been highlighted as possible markers associated with cancer and other diseases. In this study, the aim was to evaluate these polymorphisms and TGFB1 plasma levels, and to determine its association with susceptibility and prognosis in childhood patients with ALL. Analysis of genetic polymorphisms was performed by polymerase chain reaction method by evaluation of restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and TGFB1 plasma levels were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). There were not observed associations between two polymorphisms (rs1800468 and rs1800469) with susceptibility or risk of relapse in ALL ($p>0.05$). In protein expression analysis, the polymorphisms of promoter region were not associated to changes of TGFB1 plasma concentration. However, patients with ALL showed significantly decreased mean TGFB1 concentration when compared to controls ($p<0.0001$). Chemotherapy seems to exert influence in modulation of plasma concentration of this cytokine. In diagnosis, patients with ALL showed lower plasma levels when compared to treatment ($p=0.008$) and remission ($p=0.002$). Moreover, TGFB1 plasma concentration in patients was restored during remission, being similar to control group ($p=0.95$). Therefore, this study demonstrates the effects of a deregulated immune function in childhood ALL concerning to TGFB1 and indicates a possible regulation of TGFB1 induced by ALL treatment.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia. TGFB1. Genetic polymorphism. ELISA. Chemotherapy..

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Variações morfológicas da LLA segundo o FAB. 18
- Figura 2** – Análise dos polimorfismos da região promotora do gene *TGFB1*. 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação imunofenotípica das LLA segundo o EGIL.	19
Tabela 2 – Classificação das leucemias agudas/linfomas linfoblástica B e T segundo a OMS 2016.....	20
Tabela 3 – Anormalidades moleculares e citogenéticas na LLA.	22
Tabela 4 – Classificação de risco na LLA.....	26
Tabela 5 – Concentrações dos reagentes utilizados na reação.	34
Tabela 6 – Condições utilizadas para a amplificação da região do gene <i>TGFB1</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ACS	Sociedade Americana de Câncer (do inglês: American Cancer Society)
AgNO ₃	Nitrato de prata
<i>AML1</i>	Gene da leucemia mieloide aguda 1 (conhecido como <i>RUNX1</i>)
AMP _c	3',5' Monofosfato de adenosina cíclico
<i>APEX1</i>	Gene da endodeoxirribonuclease 1 de apurínica e apirimidínica (do inglês: <i>apurinic/apyrimidinic endodeoxyribonuclease 1 gene</i>)
<i>ATM</i>	Gene da ataxia telangiectasia mutada
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
bp	Par de base
<i>BRCA2</i>	Gene da proteína de susceptibilidade ao câncer de mama do tipo 2 (do inglês: <i>Breast Cancer Type 2 susceptibility protein</i>)
C	Citosina
CALL	Antígeno comum da leucemia linfóide aguda
CD	Marcadores ou grupo de diferenciação
<i>CDK6</i>	gene quinase 6 dependente de ciclina
<i>CDKN2A</i>	Gene do inibidor 2A de quinases dependentes de ciclinas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
<i>C-MYC</i>	Gene da mielocitomatose celular
CREB	Proteína ligante ao elemento de resposta ao AMP _c
del	Deleção
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
<i>E2A</i>	Fator de transcrição intensificador de ligação do gene E12 / gene E47 da Ig
EBV	Vírus <i>Epstein Barr</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGIL	Grupo Europeu de Classificação Imunológica das Leucemias
ELISA	Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (do inglês: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

<i>ERCC2</i>	Gene do grupo complementar da deficiência no reparo de complementação cruzada no reparo de excisão de roedores (do inglês: <i>excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2 gene</i>)
ETP	Precursor da célula T precoce
<i>ETS</i>	Gene do fator de transformação específica do eritroblasto (do inglês: <i>Erythroblast transformation-specific</i>)
<i>ETV6</i>	Gene da variante 6 do fator de transcrição ETS
FAB	Grupo Franco-Américo-Britânico
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
G	Guanina
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia na Infância
GDF	Fatores de crescimento e diferenciação
GDNF	Fatores neurotróficos derivados da glia
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HCL	Hospital do Câncer de Londrina
HLA-D	Antígeno Leucocitário Humano – classe II DR
<i>HLF</i>	Gene do fator hepático da leucemia
<i>HOX</i>	Gene <i>Homeobox</i>
HRV+SAV	Anticorpo secundário biotilado <i>Horseradish</i> peroxidase conjugado com Streptavidina
HS	Células-tronco hematopoiéticas
HTLV-	Vírus Linfotrópico da célula T humana 1
<i>iAMP2</i>	Gene da amplificação intracromossomal do cromossomo 21
IC	Intervalo de Confiança
Ig	Imunoglobulina
<i>IGH</i>	Gene da cadeia pesada da imunoglobulina
IL-10	Interleucina 10
<i>IL3</i>	Gene da interleucina 3
INCA	Instituto Nacional de Câncer
<i>KLR</i>	Gene do receptor do tipo lectina do membro 1 da subfamília K
<i>KMT2</i>	Gene da lisina metiltransferase 2A
LDH	Lactato desidrogenase

LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LNH	Linfoma não-Hodgkin
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
miR	Micro RNA pequeno não-codificador
<i>MLL</i>	Gene da leucemia de linhagem mista ou linfoide/mieloide
MPO	Enzima mieloperoxidase
MRD	Doença Residual Mínima
mRNA	RNA mensageiro
NaOH	Hidróxido de sódio
<i>NBN</i>	Gene da nibrina
ng	Nanograma
NK	Células <i>Natural Killer</i>
<i>NKG2D</i>	Gene da célula NK do membro D do grupo 2
nm	Nanômetro
<i>Notch</i>	Gene da proteína homóloga 1 a Notch loco neurogênico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Razão de chances (do inglês: <i>Odds Ratio</i>)
PAS	Ácido periódico de Schiff
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>PBX1</i>	Gene <i>homeobox 1</i> da leucemia de célula pré-B
<i>RAD51</i>	Gene da RAD51 recombinase da <i>Saccaromyces cerevisiae</i>
Rb	Proteína retinoblastoma
RFLP	Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa
<i>RUNX</i>	Gene do fator de transcrição relacionada ao runt-1
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismo de base única
t	Translocação
T	Timina
<i>TAL</i>	Gene da leucemia linfoblástica aguda de célula T 2
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>

<i>TCF3</i>	Gene do fator de transcrição 3 (também conhecido como <i>E2A</i>)
<i>TCR</i>	Gene do receptor da célula T
TdT	Enzima nuclear deoxinucleotidil transferase terminal
<i>TEL</i>	Oncogene <i>TEL</i> (também conhecido como <i>ETV6</i>)
TGFB	Fator de crescimento transformador beta
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TMB	3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina
v	Variável
<i>XRCC4</i>	Gene do complemento cruzado no reparo de raio-X (do inglês: <i>X-ray repair cross complementing 4 gene</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA	15
1.1.1	Classificação da LLA	17
1.1.2	Fisiopatologia da LLA	21
1.1.3	Aspectos Clínicos da Doença	23
1.1.4	Diagnóstico Laboratorial	24
1.1.5	Fases Clínicas e Classificação de Risco da LLA	25
1.2	FATORES DE CRESCIMENTO TRANSFORMADORES BETA (TGFB)	26
1.2.1	Polimorfismos Genéticos	28
1.2.2	Polimorfismos do Gene <i>TGFB1</i> no Câncer e Expressão Proteica.....	29
2	OBJETIVOS	32
2.1	OBJETIVO GERAL	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	COLETA DE AMOSTRAS	33
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA	33
3.3	GENOTIPAGEM DO <i>TGFB1</i> POR PCR-RFLP	34
3.4	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DO TGFB1	36
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
	REFERÊNCIAS	38
4	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	49
5	CONCLUSÕES	63
	ANEXOS	64
	ANEXO A – Aprovação do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina.....	65
	ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	66

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2015b) estimou para o ano de 2016, 420.310 casos novos de câncer, excluindo tumores de pele não melanoma, sendo que, destes aproximadamente 12.600 casos são em crianças e adolescentes até os 19 anos. Para as leucemias, foram estimados 5.540 casos novos em homens e 4.530 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 5,63 e 4,38 casos novos a cada 100 mil homens e mulheres, respectivamente.

As leucemias são grupos de doenças hematológicas com conceito biológico, apresentação clínica, prognóstico e resposta ao tratamento diferentes, caracterizada pela presença de uma população de células anormais suprimindo a produção normal dos componentes celulares do sistema hematopoiético (Polychronakis *et al.*, 2013).

A origem das leucemias provém das células tronco hematopoiéticas (HSCs) e precursoras na medula óssea, promovendo proliferação e infiltração das células leucêmicas (Konopleva e Jordan, 2011; Azizidoost *et al.*, 2014). De uma forma generalizada, as neoplasias hematológicas são classificadas de acordo com a linhagem, grau de maturação e forma de acometimento celular na medula óssea. As neoplasias da linhagem mieloide podem incluir granulócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), monócitos, eritrócitos, plaquetas (derivados dos megacariócitos) e mastócitos. Em contrapartida, da linhagem linfoide corresponde às leucemias de células B ou T e natural killer (NK) (Vardiman *et al.*, 2009).

1.1 LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

A leucemia linfoide aguda (LLA) é uma desordem maligna das células progenitoras da linhagem linfoide que afeta tanto a faixa pediátrica quanto adulta (Armstrong e Look, 2005; Pui *et al.*, 2008), porém as crianças e adolescentes são os mais acometidos por esta neoplasia (Acs, 2016a).

De acordo com a Sociedade Americana de Câncer (ACS) (Acs, 2016b), no ano de 2016 foram observados 6.590 novos casos de LLA, sendo 3.590 em homens e 3.000 em mulheres, e 1.430 mortes sendo 800 homens e 630

mulheres. No Brasil, a incidência de leucemia infantil de modo geral, entre 1999 e 2010, em 17 cidades capitais e Distrito Federal registrou 74,52 casos por milhão de habitantes com pico de incidência entre 4 e 5 anos em ambos os sexos, da qual 67,77 dos casos registrados foram de LLA (De Souza Reis *et al.*, 2016).

Acredita-se que a LLA pode ser originada de interações entre exposições exógena e endógena, susceptibilidade genética (herdada) ou ao acaso, (Greaves e Wiemels, 2003; Inaba *et al.*, 2013).

Um dos fatores ambientais mais relacionado é o envolvimento da radiação ionizante, e as leucemias pediátricas são mais incidentes, principalmente na LLA e a leucemia mieloide aguda (LMA) (Belson *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2016). A exposição potencial de crianças à radiação ionizante em crianças pode ocorrer durante a fase gestacional ou no período pós-natal (Belson *et al.*, 2007).

Em um estudo de associação de haplótipos com a exposição aos raios-X para diagnóstico rotineiro, Chokkalingam *et al.* (2011) observaram que, ao analisar 32 genes responsáveis pelas vias de reparo do DNA e do ciclo celular, haplótipos de 4 genes - *APEX1*¹, *BRCA2*², *RAD51*³ e *ERCC2*⁴ demonstraram uma associação de risco e 3 genes - *NBN*⁵, *XRCC4*⁶ e *CDKN2A*⁷ foram associados com alterações genéticas estruturais e numéricas em pacientes com LLA, mostrando que a susceptibilidade genética pode ser modificada pela exposição à radiação ionizante.

Outros fatores ambientais incluem os hidrocarbonetos, em especial o benzeno, os pesticidas, e o consumo de álcool, cigarro e drogas ilícitas durante a gestação, os quais têm sido descritos como fatores predisponentes à LLA infantil (Infante-Rivard *et al.*, 1999; Hashibe *et al.*, 2005; Metayer *et al.*, 2013). Alguns agentes biológicos, como os vírus - vírus *Epstein Barr* (EBV) e vírus linfotrópico da célula T humana 1 (HTLV-1) - também permanecem como fatores de risco para LLA,

¹ *APEX1* - Gene da endodeoxirribonuclease 1 de apurínica e apirimidínica (do inglês: *apurinic/aprimidinic endodeoxyribonuclease 1 gene*).

² *BRCA2* - Gene da proteína de susceptibilidade ao câncer de mama do tipo 2 (do inglês: *Breast Cancer Type 2 susceptibility protein*).

³ *RAD51* - Gene da RAD51 recombinase da *Saccharomyces cerevisiae*.

⁴ *ERCC4* - Gene do grupo complementar da deficiência no reparo de complementação cruzada no reparo de excisão de roedores (do inglês: *excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2 gene*).

⁵ *NBN* - Gene da nibrina.

⁶ *XRCC4* - Gene do complemento cruzado no reparo de raio-X (do inglês: *X-ray repair cross complementing 4 gene*).

⁷ *CDKN2A* - Gene do inibidor 2A de quinases dependentes de ciclinas.

no sentido de que podem desregular a resposta imunológica, ou ainda a ausência de contato com micro-organismos durante a infância (Greaves, 2006; Inaba *et al.*, 2013).

1.1.1 Classificação da LLA

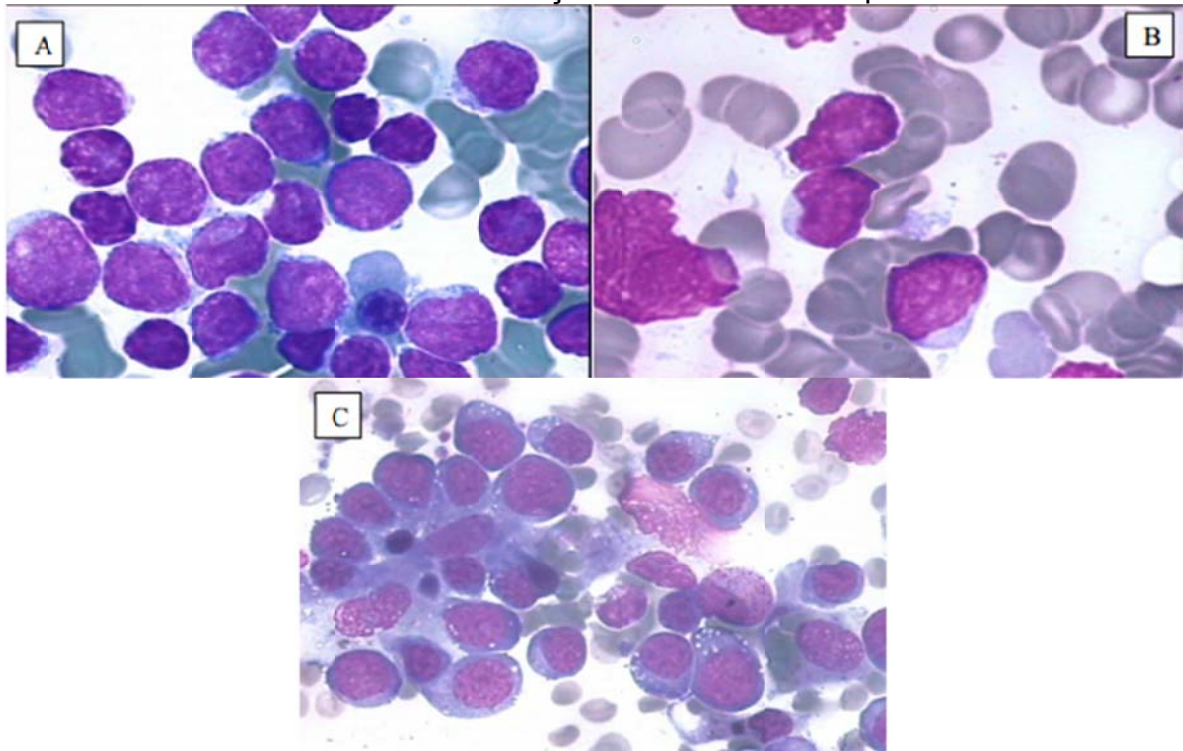
A LLA se caracteriza pela proliferação de células imaturas derivadas da medula óssea, chamada de blastos, que podem envolver o sangue periférico ou os órgãos sólidos, bem como o sistema nervoso central (SNC) e os testículos. A porcentagem de blastos necessários na medula óssea para o diagnóstico das leucemias agudas foi ajustado para pelo menos 20%, e não requer porcentagem mínima de blastos quando as características citogenéticas e morfológicas estão presentes (Abdul-Hamid, 2011).

Três modelos são utilizados para subclassificação da LLA: (1) modelo criado pelo grupo Franco-Américo-Britânico (FAB) que leva em consideração a análise morfológica e citoquímica (Bennett *et al.*, 1976); (2) modelo criado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1976 e atualizada em 2016 que classifica a LLA pela citogenética (Mathé e Rappaport, 1976; Arber *et al.*, 2016) (3) e o Grupo Europeu de Classificação Imunológica das Leucemias (EGIL) que caracteriza as diferentes LLAs pela imunofenotipagem (Bene *et al.*, 1995).

A avaliação morfológica da medula óssea representa o primeiro critério do diagnóstico na diferenciação da LLA e LMA, sendo útil para distinguir mieloblastos de linfoblastos (Lai *et al.*, 2000). No entanto, vale ressaltar que a citometria de fluxo é considerada o padrão ouro para diagnóstico, com finalidade de identificar as diferentes linhagens celulares (Chiaretti *et al.*, 2014).

Na classificação elaborada pelo grupo FAB (figura 1), a qual foi descrita na década de 70, e hoje encontra-se em desuso, era levado em consideração os critérios citomorfológicos dos blastos obtidos da medula óssea e sangue periférico. Desta maneira, a LLA era classificada em blastos do tipo L1, L2 e L3, por meio de dois critérios: (1) a ocorrência das características citológicas e (2) o grau de heterogeneidade entre as células leucêmicas. Além disso, estas características eram avaliadas de acordo com o diâmetro celular, formato do núcleo, presença ou ausência do nucléolo, volume citoplasmático, grau da basofilia do citoplasma, variações de vacúolos citoplasmáticos e relação núcleo/citoplasma (Bennett *et al.*, 1976; Abdul-Hamid, 2011).

Figura 1 – Variações morfológicas da LLA segundo o FAB. A) LLA subtipo L1: os linfoblastos são pequenos e as características nucleares e citoplasmáticas aparentam uniformidade com citoplasma escasso, formato nuclear regular, cromatina parcialmente condensada com nucléolos pouco visíveis e razão núcleo/citoplasma alta; B) LLA subtipo L2: os linfoblastos estão variáveis em relação ao tamanho com contornos nucleares irregulares, cromatina heterogênea, citoplasma moderadamente abundante e pouco basofílico, nucléolos grandes e proeminentes e razão núcleo/citoplasma variável; C) LLA subtipo L3 (Burkitt): os linfoblastos são grandes e bastante homogêneos, a cromatina com pontilhado finamente granular com nucléolo proeminente e basofilia evidente. Presença de vacúolos no citoplasma.



Fonte: Adaptado de (Chiaretti *et al.*, 2014).

A ausência de um critério padronizado para classificação de subgrupos imunofenotípicos, de estudos prospectivos controlados no tratamento e LLA do tipo B e T, e de estratégias terapêuticas diferentes comprometeram a avaliação do impacto prognóstico dos estudos imunofenotípicos na LLA (Ludwig *et al.*, 2003). Para este problema o grupo EGIL propôs uma classificação para estratificar as leucemias agudas somente com base na imunofenotipagem pela citometria de fluxo (Bene *et al.*, 1995). Além disso, a citometria de fluxo confirma a quantificação citomorfológica de blastos e fornece informações sobre determinado subtipo e linhagem envolvidos (Mckenna, 2001; Craig e Foon, 2008).

Tabela 1 – Classificação imunofenotípica das LLA segundo o EGIL.

Classificação	Imunofenótipo	Frequência	
LLA de linhagem B	HLADR, CD19 ⁺ , e/ou CD79a ⁺ , e/ou CD22 ⁺ , e/ou CD24 ⁺ , e/ou CD34 ⁺	Adultos	Crianças
BI (Pró-B)	CD19 ⁺ , CD22 ⁺ , CD34 ⁺ , TdT ⁺ , cCD79a ⁺ , CD10 ⁺	11%	5-9%
BII (B comum)	CD10 ⁺ (CALLA), TdT ⁺	49%	53-65%
BIII (Pré-B)	CD19 ⁺ , CD22 ⁺ , CD34 ⁺ , TdT ⁺ , cIgM ⁺	12%	14-20%
BIV (B madura)	Ig (citoplasma ou superfície), TdT ⁻ , CD34 ⁻	2-4%	2-3%
LLA de linhagem T	CD1a, CD2, CD3 ⁺ (citoplasma/superfície), CD4, CD5, CD7, CD8, CD34	25%	11-16%
TI (Pró-T)	cCD3 ⁺ , CD7 ⁺	7%	
TII (Pré-T)	cCD3 ⁺ , CD7 ⁺ , CD2 ⁺ e/ou CD5 ⁺ e/ou CD8 ⁺		
TIII (T cortical ou tímica)	CD1a ⁺ , cCD3 ⁺ , sCD3 ^{+/-}	17%	
TIV (T madura)	cCD3 ⁺ , sCD3 ⁺ , CD1a ⁻	1%	

CD: marcadores de diferenciação (*cluster of differentiation*); c: citoplasmático; s: superfície; CALLA: antígeno comum da LLA; HLA-DR: Antígeno Leucocitário Humano do tipo DR da classe II; Ig: Imunoglobulina.

Fonte: Adaptado de (Abdul-Hamid, 2011; Chiaretti *et al.*, 2014)

De acordo com os critérios do EGIL, para caracterizar as leucemias a marcação imunofenotípica com anticorpo monoclonal deve atingir um limite mínimo de 20% para definir uma reação positiva de blastos, exceto para mieloperoxidase (MPO), CD3, CD79a e enzima nuclear deoxinucleotidil transferase terminal (TdT), as quais são considerados positivos no nível de expressão de 10% (Bene *et al.*, 1995; Bene *et al.*, 2011). Por meio disto, foi possível identificar que aproximadamente 75-80% dos casos de LLA em adultos pertencem à linhagem de células B e 20-25% da linhagem T (Chiaretti *et al.*, 2014).

No ano de 2016, a OMS apresentou uma revisão da classificação prévia das leucemias da edição de 2008 (tabela 2), com objetivo de incorporar novos dados clínicos, prognósticos, morfológicos, imunofenotípicos e genéticos que surgiram desde a última edição (Arber *et al.*, 2016).

Tabela 2 – Classificação das leucemias agudas/linfomas linfoblástica B e T segundo a OMS 2016.

Leucemia/linfoma linfoblástica B
Leucemia/linfoma linfoblástica B sem anormalidade genética especificada
Leucemia/linfoma linfoblástica B com anormalidades genéticas recorrentes
Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(v;11q23.3); rearranjo <i>KMT2A</i>
Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(12;21)(p13.2;q22.1); <i>ETV6-RUNX1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástica B com hiperdiploidia
Leucemia/linfoma linfoblástica B com hipodiploidia
Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(5;14)(q31.1;q32.3); <i>IL3-IGH</i>
Leucemia/linfoma linfoblástica B com t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i>
Entidade provisória: Leucemia/linfoma linfoblástica B, <i>BCR-ABL1-like</i>
Entidade provisória: Leucemia/linfoma linfoblástica B com <i>iAMP21</i>
Leucemia/linfoma linfoblástica T
Entidade provisória: Leucemia/linfoma linfoblástica T precoce
Entidade provisória: Leucemia/linfoma linfoblástica de célula <i>Natural Killer</i> (NK)

KMT2A: gene da leucemia de linhagem mista ou linfóide/mieloide; *ETV6*: gene da variante 6 do fator de transcrição transformação específica do eritroblasto (*erythroblast transformation-specific*) (ETS); *RUNX1*: fator de transcrição relacionada ao runt-1 ou gene leucemia mieloide aguda-1 (*AML1*); *IL3*: gene da interleucina-3; *IGH*: gene da imunoglobulina de cadeia pesada; *TCF3*: gene do fator de transcrição 3 (também conhecido como E2A); *PBX1*: gene homeobox 1 da leucemia de célula pré-B; *iAMP21*: gene da amplificação intracromossomal do cromossomo 21; t: translocação; v: variável.

Fonte: Adaptado de (Arber *et al.*, 2016)

Na LLA do tipo B, são descritas anormalidades genéticas e estão associados com características clínicas, imunofenotípicas e de prognóstico (Mittelman, 1981; Bloomfield *et al.*, 1986; Harbott *et al.*, 1997; Johansson *et al.*, 2004; Pui *et al.*, 2008). Além disso, dois novos tipos de anormalidades genéticas foram incorporadas na classificação – (1) LLA tipo B com amplificação intracromossomal do cromossomo 21, associada com prognóstico adverso, podendo resultar numa terapia mais agressiva (Harrison *et al.*, 2014) e (2) translocações envolvendo tirosina quinases ou receptores de citocinas (“*BCR-ABL1-like ALL*”), associada a características clínicas adversas e pior prognóstico (Den Boer *et al.*, 2009; Mullighan *et al.*, 2009).

Para LLA do tipo T, o perfil das anormalidades genéticas não são notoriamente associados a uma única característica biológica, e portanto, sem subdivisão conforme as alterações genéticas (Vardiman *et al.*, 2009). No entanto, existe um subconjunto que é reconhecido como uma nova entidade provisória, que é a LLA do tipo célula T precoce (ETP), única subdivisão genética e imunofenotípica aceita, indicando somente a diferenciação de célula T precoce, com retenção de algumas características da célula-tronco e da linhagem mieloide (Coustan-Smith *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012; Neumann, Coskun, *et al.*, 2013; Neumann, Heesch, *et al.*, 2013).

1.1.2 Fisiopatologia da LLA

O câncer de modo geral, incluindo as leucemias, compartilham uma característica biológica semelhante – a clonalidade. As alterações moleculares que são necessárias para o desenvolvimento de uma doença maligna são um fenômeno raro, considerando-se o número vasto de células-alvo susceptíveis a esta condição, isto é, uma pequena alteração genética raramente é suficiente para desenvolvimento do tumor maligno. (Gallegos-Arreola *et al.*, 2013).

Então, sabe-se que a LLA é derivada de lesões genéticas nas células progenitoras sanguíneas que são destinadas a sofrer diferenciação na linhagem celular T ou B, incluindo mutações que transmitem a capacidade autoproliferativa, seguida de parada do desenvolvimento em um estágio específico (Pui, Relling, *et al.*, 2004; Armstrong e Look, 2005). Muitas alterações genéticas ocorrem na LLA, sendo que, na maioria dos casos infantis são alterações cromossômicas (tabela 3) (Harrison, 2009).

Aproximadamente 75% dos casos de LLA infantil com alterações cromossômicas são detectáveis pela análise de cariótipo, hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e outras técnicas moleculares. A LLA de célula B inclui hiperdiploidia, hipodiploidia e pseudodiploidia e, da célula T é caracterizada pelas mutações ativadoras do gene da proteína homóloga 1 a Notch loco neurogênico (*Notch1*) e rearranjos dos fatores de transcrição, como proteína da leucemia de linhagem mista ou linfoide/mieloide (MLL). Apesar de os rearranjos genéticos demonstrarem importância nos eventos precoces da leucemogênese e serem amplamente usados no diagnóstico e estratificação de risco, ainda é insuficiente para explicar completamente o desenvolvimento da leucemia (Mullighan e Downing, 2009; Mullighan, 2012).

Tabela 3 – Anormalidades moleculares e citogenéticas na LLA.

Categoria	Citogenética	Genes envolvidos	Frequência	
			Adultos (%)	Crianças (%)
Hiperdiploidia			2-15	10-26
Hipodiploidia			5-10	5-10
Pseudodiploidia	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL1</i>	15-25	2-6
	del(9)(q21-22)	<i>p15,p16</i>	6-30	20
	t(4;11); t(9;11); t(11;19); t(3;11)	<i>MLL</i>	5-10	<5
	del(11)(q22-23)	<i>ATM</i>	25-30	15
	t(12;21)(p12;q22)	<i>TEL-AML1</i>	<1	20-25
	t(1;19)	<i>E2A-PBX1</i>	<5	<5
	t(17;19)	<i>E2A-HLF</i>	<5	<5
	t(1;14)(p32;q11)	<i>TAL1</i>	10-15	5-10
	t(7;9)(q34;q32)	<i>TAL2</i>	<1	<1
	t(10;14)(q24;q11)	<i>HOX11</i>	5-10	<5
	t(5;14)(q35;q32)	<i>HOX11L2</i>	1	2-3
	t(1;14)(p32;q11)	<i>TCR</i>	20-25	20-25
	del(13)(q14)	<i>miR15/miR16</i>	<5	<5
	t(8;14); t(8;22); t(2;8)	<i>C-MYC</i>	5	2-5
	+8	?	10-12	2
	del(7p)	?	5-10	<5
del(5q)	?	<2	<2	
del(6q); t(6;12)	?	5	<5	

MLL: também conhecido como *KMT2A*; *ATM*: gene da ataxia telangiectasia mutada; *TEL*: também conhecido como *ETV6*; *AML1*: também conhecido como *RUNX1*; *HLF*: fator hepático da leucemia; *TAL*: gene da leucemia linfoblástica aguda de célula T 2; *HOX*: gene *homeobox*; *TCR*: gene do receptor de célula T; *miR*: gene do microRNA; *C-MYC*: gene da mielocitomatose celular; del: deleção; +8: trissomia no cromossomo 8; p: braço curto do cromossomo; q: braço longo do cromossomo. **Fonte:** Adaptado de (Jabbour *et al.*, 2015).

As modificações epigenéticas têm demonstrado um papel fundamental na influência da expressão gênica (Deaton e Bird, 2011; Easwaran *et al.*, 2014). A análise de perfis de metilação de DNA em pacientes pediátricos LLA de célula B mostraram hipermetilação da região promotora como uma característica proeminente, afetando genes previamente implicados na leucemia e em outras doenças hematológicas (Wong *et al.*, 2012).

Outro mecanismo epigenético importante é a atuação dos miRNAs, que são reguladores epigenéticos, com o RNA mensageiro (mRNA) como alvo específico, para modular os padrões da expressão gênica e vias de sinalização celular. O perfil de expressão dos miRNAs no câncer pode predizer o prognóstico do paciente e a resposta ao tratamento (Bouchie, 2013; Stahlhut e Slack, 2013; Hayes *et al.*, 2014). Além disso, os miRNAs estão sendo usados para diferenciar a linhagem de célula B e T (Yeh *et al.*, 2016).

Por conseguinte, pode-se deduzir que a fisiopatologia da LLA envolve mecanismos genéticos e epigenéticos, além de regulação por miRNAs. O

estudo destes fatores pode identificar marcadores na progressão da doença e um direcionamento ao tratamento. Não obstante, ponto primordial na fisiopatologia é a sua origem monoclonal, proliferação descontrolada, longevidade celular condicionada pela diminuição da apoptose e geração da resistência ao tratamento (Gallegos-Arreola *et al.*, 2013; Yeh *et al.*, 2016).

1.1.3 Aspectos Clínicos da Doença

O desenvolvimento da leucemia é decorrente de uma célula neoplásica precursora da hematopoiese com incapacidade de se diferenciar e alta capacidade de proliferação. Estas células precursoras sem maturação podem substituir as células hematopoiéticas normais e ocupar grande parte da medula óssea, levando a falência medular (Lorenzi, 2006; Almeida, 2009).

Os blastos leucêmicos primeiramente infiltram a medula óssea, ocupando mais de 20% (pela OMS) ou mais de 30% (pelos critérios da FAB) do total de células nucleadas, chegando a 80-100% de ocupação. A primeira consequência é a supressão da hematopoiese normal. Na verdade, a expansão dos blastos neoplásicos ocupa o espaço necessário à produção fisiológica das células hematológicas na medula, acarretando deficiência das outras linhagens celulares como hemácias, plaquetas e neutrófilos, causando anemia, trombocitopenia e/ou leucocitose com presença blastos. Os blastos anormais também secretam fatores inibitórios e indutores de fibrose, tornando a disfunção medular mais grave do que o esperado apenas pela simples ocupação de espaço (Lorenzi, 2006). Os blastos neoplásicos são lançados na corrente sanguínea, justificando o termo leucemia (células brancas no sangue), eventualmente atingindo um número suficiente para determinar uma leucocitose. Uma vez na corrente sanguínea, os blastos podem então infiltrar os órgãos, com uma preferência para os linfonodos, baço, fígado, gengiva, órbita, sistema nervoso central, testículos e pele (Lorenzi, 2006).

A apresentação clínica na LLA acontece de forma súbita. Geralmente, os pacientes apresentam dispneia, fadiga ou sangramento espontâneo e, indisposição, letargia, perda de peso, febre e sudorese noturna de uma forma mais frequente. Além disso, podem aparecer linfadenopatia, esplenomegalia e/ou hepatomegalia. As neuropatias cranianas e infiltração testicular (aproximadamente 2% do gênero masculino) podem ocorrer devido às recidivas ou recaídas

extramedulares, enquanto náusea, vômito, cefaleia ou papiledema são resultantes de infiltração meníngea e/ou obstrução do fluído do líquido do líquido (Borim *et al.*, 2000; Farhi e Rosenthal, 2000; Cornacchioni *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2004; Hamerschlag, 2008; Larson e Anastasi, 2008; Locatelli *et al.*, 2012).

Os pacientes podem apresentar dores ósseas em 25% dos casos, com lesões ósseas, osteopenia difusa, dores lombares ou artrite assimétrica e, por consequência da infiltração leucêmica pelos blastos, leva-se a hemorragia óssea (Gur *et al.*, 1999; Ikeuti *et al.*, 2006).

1.1.4 Diagnóstico Laboratorial

Quanto ao diagnóstico inicial das leucemias, é realizado um exame físico do paciente, seguido de análise quantitativa e qualitativa do sangue total por meio da confecção da extensão (esfregaço) sanguínea e hemograma. Para confirmação do diagnóstico são realizados punção e biópsia de medula óssea (imunofenotipagem) e análise citogenética (Pui, Schrappe, *et al.*, 2004; Manisha, 2012).

No hemograma de pacientes suspeitos, em especial de LLA, é observado anemia normocítica e normocrômica, contagem diminuída de reticulócitos, trombocitopenia e leucocitose associada à presença significativa de blastos (Farias e Castro, 2004; Almeida, 2009; Ferri, 2012; Veras *et al.*, 2012).

Após análise do hemograma, é solicitado o mielograma para estimar a porcentagem de blastos na microscopia pela punção aspirativa da medula óssea na região lombar. A caracterização de mais de 20% de blastos na medula óssea, megacariócitos diminuídos ou ausentes e células precursoras mieloides e eritroides com aspectos normais são confirmatórios para a LLA (Farias e Castro, 2004; Almeida, 2009; Rego e Santos, 2009).

A análise citoquímica, utilizada em menor escala hoje em dia, auxilia na diferenciação entre LLA e LMA, em que as reações mieloperoxidase e Sudan black são negativas para LLA. Os blastos da linhagem T revelam atividade ótima em pH ácido, isto é, respondem com fosfatase ácida. Ao ácido periódico de Schiff (PAS), a reação negativa é mais frequente na LLA da linhagem T a linhagem B. Entretanto, existem casos de LLA do tipo L3 em que o PAS é positivo (Bennett *et al.*, 1976; Farias e Castro, 2004; Verrastro, 2005).

A imunofenotipagem por citometria de fluxo é um método utilizado como ferramenta padrão e indispensável na área clínica para diagnóstico diferencial, classificação, estadiamento e monitoramento da doença residual mínima (MRD) das leucemias agudas e síndromes mielodisplásicas. Com o uso de anticorpos monoclonais é possível identificar diferentes linhagens celulares e determinar o grau de maturação celular (Orfao *et al.*, 2004; Craig e Foon, 2008). Por meio desses recursos, o direcionamento para o tratamento acaba sendo mais eficaz com evasão da falha terapêutica.

1.1.5 Fases Clínicas e Classificação de Risco da LLA

O tratamento para LLA normalmente é dividido em três fases – a fase de indução, intensificação (ou consolidação) e manutenção. A fase de indução da remissão completa é definida como restabelecimento da hematopoiese normal em que, espera-se conduzir a um estado com menos de 5% de blastos na medula óssea e ausência de qualquer sinal ou sintoma da doença. Quando esta fase é concluída, os pacientes ainda podem apresentar graus variados de leucemia residual e alguns podem portar até 10 bilhões de células leucêmicas (Campana e Pui, 1995; Pui e Campana, 2000; Cazé *et al.*, 2010).

Após o restabelecimento da hematopoiese normal, os pacientes se tornam candidatos para terapia de intensificação, a qual se refere à readministração do regime terapêutico da indução ou administração de altas doses de agentes quimioterápicos que não foram usadas na fase de indução. O objetivo é diminuir o número de células tumorais a níveis muito baixos, ou eliminá-las (Kaushansky *et al.*, 2016).

A fase final do tratamento pode durar 2 anos. Os acúmulos de altas concentrações intracelulares de metabólitos ativos dos medicamentos e a administração combinada aos limites de tolerância têm sido associados com melhora no desfecho clínico (Schmiegelow *et al.*, 1995; Chessells *et al.*, 1997). Na fase de manutenção, o objetivo é eliminar resíduos de células leucêmicas pois, estas têm o potencial de recidivar a doença, porém não interferem no desenvolvimento das células sanguíneas normais (Inaba *et al.*, 2013).

O Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia na Infância (GBTLI), atualizado em 2009, classifica os pacientes em dois grandes grupos de risco, de

acordo com parâmetros hematológicos e a resposta terapêutica (Tabela 4). Assim, a determinação de um protocolo de tratamento diferenciado para cada grupo de risco acaba se tornando viável. De acordo com o protocolo do GBTLI, os pacientes classificados como baixo risco durante o tratamento e que apresentem requisitos para inclusão do grupo de alto risco, devem ser reclassificados (Inca, 2001; Cazé *et al.*, 2010).

Tabela 4 – Classificação de risco na LLA.

	Baixo Risco	Alto Risco
Idade	≥1 ano a <9 anos	<1 ano e >9 anos
Leucometria ao diagnóstico	<50.000/mm ³	≥50.000/mm ³
Leucometria no 7º dia de tratamento	<5.000/mm ³	≥5.000/mm ³ *
Blasto no sangue periférico e comprometimento medular no 14º dia de tratamento	Ausência de blastos e baixo comprometimento medular	Presença de blastos e/ou comprometimento medular extenso
Medula no 28º dia de indução	Baixa contagem de células leucêmicas	Evidência de acometimento extramedular ao final da indução
Comprometimento do SNC	Ausência de blastos no líquido no 14º dia de tratamento	Persistência de blastos leucêmicos

*Respondedores lentos ao tratamento; SNC: Sistema Nervoso Central.

Fonte: (Inca, 2001; Cazé *et al.*, 2010).

Em suma, a LLA é um tipo de câncer que demonstra uma complexidade desde a patogênese até o estabelecimento do diagnóstico e tratamento. Além disso, vários fatores intrínsecos podem influenciar no curso da doença. Desta maneira, há necessidade de investigar algumas moléculas do sistema imunológico como fatores de crescimento envolvidos na regulação da hematopoiese.

1.2 FATORES DE CRESCIMENTO TRANSFORMADORES BETA (TGFB)

A família do TGFB pertence a um grupo que compreende fatores de crescimento que desempenham papéis fundamentais tanto em processos fisiológicos quanto patológicos. Dentro desta família incluem as subfamílias das ativinas e inibinas, das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), dos fatores de crescimento e diferenciação (GDFs) e dos fatores neurotróficos derivados da glia (GDNFs) e dos fatores de crescimento transformadores B (TGFB) (Kubiczkova *et al.*, 2012).

Na subfamília TGFB existem três isoformas codificadas por diferentes genes, conhecidas por TGFB1, TGFB2 e TGFB3, que podem atuar pelas mesmas vias de sinalização, e que contêm algumas regiões altamente conservadas, mas divergentes em outras regiões de aminoácidos (Cheifetz *et al.*, 1987; Mittl *et al.*, 1996). Além disso, as isoformas podem apresentar padrões distintos de expressão durante a embriogênese, revelando fenótipos distintos e não redundantes em animais *knockout* para cada uma delas (Chang *et al.*, 2002). Destas, a isoforma mais abundante e expressa é o TGFB1 (Derynck *et al.*, 1985).

O TGFB1 é uma citocina altamente pleiotrópica, isto é, pode exercer várias funções, como regulador do crescimento celular, diferenciação, apoptose, motilidade, invasão, produção da matriz extracelular, angiogênese e resposta imune. No entanto, em nível de célula tumoral, a citocina pode apresentar funções opostas. Nos estágios precoces do desenvolvimento do tumor, o TGFB opera como um supressor tumoral, enquanto que nos estágios mais tardios, ele desencadeia o oposto, favorecendo a invasão e causando metástase através da modulação do sistema imune e do microambiente tumoral (Syed, 2016).

Igualmente, esta citocina tem a capacidade de inibir a proliferação de células epiteliais e hematológicas, promover transição epitélio-mesenquimal em células tumorais e a troca de fenótipo de células do estroma tumoral, de modo a promover a progressão do câncer (Kubiczkova *et al.*, 2012). Em especial, na hematopoiese, dependendo da sua concentração, o TGFB pode tanto inibir quanto estimular a proliferação celular, ou manter as HSCs quiescentes (Blank e Karlsson, 2015).

O TGFB é secretado por diferentes células, destacando-se os linfócitos, macrófagos, plaquetas, neutrófilos e, no processo de carcinogênese, as células tumorais. Em especial aos macrófagos, a sinalização do TGFB promove sua mudança de fenótipo para o subtipo M2, exercendo função anti-inflamatória ou pró-regenerativa, com capacidade de inibir a resposta imunológica pela secreção de TGFB e interleucina 10 (IL-10), e promover remodelamento da matriz extracelular (Grotendorst *et al.*, 1989; Alleva *et al.*, 1994; Maeda *et al.*, 1995; Branton e Kopp, 1999; Sica *et al.*, 2008; Vignali *et al.*, 2008; Pickup *et al.*, 2013).

Além de o TGFB participar na regulação sobre as HSCs, esta citocina também interage no microambiente da medula óssea, devido à ativação das células de Schwann, células da glia e megacariócitos. Esta última regula o processo

de ativação de TGFB pela ligação do TGFB latente via integrina $\beta 8$ na superfície celular e exposição da citocina para a clivagem proteolítica pelas enzimas metaloproteinases (Yamazaki *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2014).

A desregulação na via de sinalização do TGFB, seja por inativação de componentes da via ou pela diminuição na modulação na sua expressão, pode desempenhar um papel crítico na transformação das células neoplásicas. Algumas neoplasias, como câncer de cólon, mama, pâncreas e fígado, são caracterizadas pelas alterações dos genes da via do TGFB (Kim e Letterio, 2003).

As alterações genéticas ou mecanismos de ativação e produção do TGFB devem ser investigados de uma maneira aprofundada tanto no processo fisiológico (principalmente na hematopoiese) como no microambiente tumoral.

1.2.1 Polimorfismos Genéticos

Dentro de uma espécie, os cromossomos homólogos são bastante similares entre si, mas em determinadas localizações do cromossomo (loci) pode haver variabilidade na sequência do DNA. Se a variação é encontrada em uma frequência superior a 1% da população, denomina-se polimorfismo (Balasubramanian *et al.*, 2004).

Algumas dessas alterações podem ocorrer nas sequências não codificadoras do gene, e na maioria dos casos, não exercem efeito em suas funções. Outras podem acontecer nas sequências codificadoras, levando à produção de proteínas defeituosas. Deste modo, em alguns casos, o polimorfismo genético pode aumentar a suscetibilidade ao câncer (Lodish *et al.*, 2000).

Na LLA, muitos estudos têm sido realizados na busca por marcadores que possam estar relacionados à suscetibilidade ou influenciar na resposta à quimioterapia (Mrozek *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2015). Por exemplo, a investigação de polimorfismos de base única (SNPs) em genes candidatos aponta que o risco de leucemias, inclusive LLA, pode ser atribuído a polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos, reparo de DNA e até mesmo, o funcionamento normal do sistema imunológico (Chokkalingam e Buffler, 2008; Urayama *et al.*, 2013).

Variantes de genes da resposta imune são potenciais fontes de variabilidade interindividual que conferem diferenças tanto ao sistema imune inato,

quanto ao adaptativo. Nos últimos anos, alguns tipos de polimorfismos têm sido reportados indicando a importância nas consequências funcionais para a estrutura e a expressão de moléculas do sistema imune (Kubistova *et al.*, 2009).

1.2.2 Polimorfismos do Gene *TGFB1* no Câncer e Expressão Proteica

O gene do *TGFB1* está localizado no loco cromossomo 19q13.1, onde foram identificados diversos polimorfismos genéticos. Dentre eles, dois polimorfismos da região promotora (rs1800468, G-800A e rs1800469, C-509T) (Cambien *et al.*, 1996) vêm sendo amplamente estudados em várias doenças, como asma, doença arterial coronariana, infecção do trato urinário, retinopatia diabética cirrose hepática, colite ulcerativa e fibrose cística (Syrris *et al.*, 1998; Silverman *et al.*, 2004; Kikuchi *et al.*, 2007; Tamizifar *et al.*, 2007; Paine *et al.*, 2012; Syukri *et al.*, 2014; Oueslati *et al.*, 2015).

Num estudo realizado por Grainger *et al.* (1999) envolvendo 170 pares de gêmeas, foi demonstrado que os níveis plasmáticos de *TGFB1* foram controlados geneticamente. Dois polimorfismos na região promotora do gene *TGFB1*: um promovendo a troca de uma guanina (G) por uma adenina (A) no nucleotídeo de número 800 anterior ao sítio de início da transcrição (rs1800468, G-800A) e outro promovendo a troca de uma citosina (C) por uma timina (T) no nucleotídeo 509 antes do sítio de início da transcrição (rs1800469, C-509T) foram avaliados. Devido à raridade do alelo A do polimorfismo G-800A, apenas o polimorfismo C-509T foi analisado para verificar a sua influência nos níveis plasmáticos de *TGFB1*. Observou-se que o alelo T estaria relacionado ao aumento dos níveis plasmáticos da citocina. No entanto, o polimorfismo G-800A ocorre em um sítio putativo de ligação de uma família de fatores de transcrição denominado de proteína ligante ao elemento de resposta ao 3' 5' monofosfato de adenosina cíclico (AMP_c) (CREB), sugerindo que este polimorfismo possa ser responsável pelo controle da expressão do gene *TGFB1* de outra forma (Grainger *et al.*, 1999).

Numa análise de associação envolvendo 100 casos e 100 controles, revelou-se que os genótipos AA do G-800A e TT do C-509T apresentaram uma associação de risco para o câncer de mama na população Sul-leste iraniana (Parvizi *et al.*, 2016).

Para o polimorfismo C-509T, dois estudos do tipo caso-controle envolvendo pacientes diagnosticados com LLA na população infantojuvenil foram realizados, porém, não houve associação estatisticamente significativa na frequência genotípica ou alélica entre casos e controles (Dai *et al.*, 2009; Healy *et al.*, 2009).

Alguns estudos de meta-análise observaram que o alelo T do polimorfismo C-509T apresenta um efeito protetor em alguns tipos de tumores sólidos, como câncer de mama e colorretal (Niu *et al.*, 2010; Liu, Yang *et al.*, 2012). No entanto, outra meta-análise revelou que o alelo C para C-509T e alelo A para G-800A estavam associados com risco e que poderiam contribuir para o desenvolvimento do câncer colorretal (Liu, Y. *et al.*, 2012).

Ainda, dois estudos de associação realizados na população chinesa demonstraram uma corroboração dos resultados, indicando o alelo T para polimorfismo C-509T como fator de risco para tumor hepático (Ma *et al.*, 2015; Wan *et al.*, 2015). Conquanto que, outro estudo observou que o alelo T estaria exercendo um efeito protetor contra o câncer de pulmão do tipo adenocarcinoma e de células pequenas (Kang *et al.*, 2006), apresentando então, resultados diferentes.

Além da análise dos polimorfismos do gene *TGFB1*, outro parâmetro a ser investigado seria a influência da secreção do TGFB1 no câncer. Dependendo do tipo de tumor sendo estudado, o TGFB parece atuar de forma distinta (Papageorgis e Stylianopoulos, 2015).

Duas análises de níveis plasmáticos do TGFB1 foram avaliadas no câncer de mama, e revelaram aumento significativo desta citocina nestes pacientes (Todorović-Raković *et al.*, 2003; Ciftci *et al.*, 2014). No entanto, um estudo num mesmo tipo de câncer revelou aumento na concentração plasmática de TGFB1 antes do procedimento cirúrgico e queda significativa nos níveis plasmáticos desta citocina na pós retirada do tumor (Kong *et al.*, 1995). Os altos níveis plasmáticos de TGFB1 também foram observados nos tumores pancreático, hepático, renal e prostático. (Shirai *et al.*, 1994; Ivanovic *et al.*, 1995; Junker *et al.*, 1996; Sinnreich *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2016).

Em relação às neoplasias hematológicas, os resultados têm-se demonstrado contraditórios. Dois estudos envolvendo 162 pacientes e 31 controles e outro com 35 pacientes e 27 controles observaram diminuição significativa nos níveis plasmáticos do TGFB1 em pacientes diagnosticados com mieloma múltiplo. No entanto, foi observado aumento na concentração plasmática da citocina em

pacientes diagnosticados com síndrome mielodisplásica, mielofibrose, trombocitopenia essencial e mielofibrose idiopática, e em pacientes com linfoma não-Hodgkin (LNH) (Kyrtsolis *et al.*, 1998; Urbańska - Rys *et al.*, 2003; Akiyama *et al.*, 2005; El-Hefni *et al.*, 2015). Notavelmente, Al-Mowallad *et al.* (2006) não encontraram diferença significativa na concentração plasmática do TGFB1 em pacientes diagnosticados com LLA.

A secreção do TGFB1 está desregulada em vários tipos de câncer, tanto em tumores sólidos quanto em neoplasias hematológicas, ocasionando progressão para a malignidade (Bellomo *et al.*, 2016). Ademais, percebe-se que a concentração plasmática desta citocina se comporta de uma maneira distinta para cada tumor analisado, indicando um envolvimento no prognóstico dos pacientes.

Pouco se sabe também sobre a influência desses polimorfismos na severidade das leucemias, e o impacto destes polimorfismos do *TGFB1* nos diferentes subtipos da LLA permanece incerto, embora possam auxiliar na compreensão da patogênese desta neoplasia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os polimorfismos rs1800468 e rs180049 da região promotora do gene *TGFB1* e os níveis plasmáticos de TGFB1 em relação à suscetibilidade e o prognóstico da leucemia linfóide aguda em pacientes infantojuvenis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos rs1800468 e rs1800469 da região promotora do gene *TGFB1* em pacientes com LLA e em indivíduos controle livre de neoplasias;
- Avaliar possíveis associações entre a presença das variantes genéticas entre os dois grupos e o risco de suscetibilidade à doença num estudo do tipo caso-controle;
- Correlacionar a presença dos polimorfismos em pacientes com LLA infantojuvenis com o risco de recidiva e óbito;
- Determinar os níveis plasmáticos de TGFB1 em pacientes com LLA e grupo controle;
- Comparar a presença dos polimorfismos da região promotora do gene *TGFB1* com os níveis plasmáticos desta citocina nos grupos caso e controle;
- Correlacionar os níveis plasmáticos de TGFB1 nos pacientes com LLA em fases clínicas diferentes (diagnóstico, tratamento e remissão).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA DE AMOSTRAS

O presente projeto foi cadastrado na Plataforma Brasil e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CEP/UUEL 189/2013 – CAAE Nº 17123113400005231). Todos os indivíduos do estudo receberam um código após assinarem o termo de consentimento, e todos os participantes do projeto e responsáveis legais pelas crianças foram orientados. Somente foram utilizadas amostras de pacientes autorizados por seus responsáveis, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Neste projeto foram coletadas 5mL do sangue periférico de 104 pacientes de 0 a 19 anos diagnosticados com LLA atendidos no Hospital do Câncer de Londrina (HCL) e 115 controles com faixa etária similar, que foram cedidos pelo Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina.

O convite aos responsáveis pelos pacientes com LLA para participarem deste projeto foi realizado durante o atendimento clínico no Serviço de Oncopediatria do Hospital do Câncer de Londrina. Além disso, estes pacientes foram classificados em alto e baixo risco de acordo com a GBTLI-LLA 2009. Os doadores para o grupo controle foram crianças da região de Londrina e como critério de inclusão foram selecionados os doadores sem histórico de neoplasia atual, processos inflamatórios e apresentando testes bioquímicos, sorológicos e hematológicos normais, como transaminase glutâmico pirúvica (TGP), transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e lactato desidrogenase (LDH).

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A partir do sangue periférico coletado em tubo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), foi extraído o DNA utilizando o kit comercial *Biopur Mini Spin Plus Kit* (*Biometrix Diagnostica*, Curitiba, Brasil) segundo as especificações do fabricante. O DNA extraído foi eluído em 50 µL de tampão de eluição e quantificado por espectrofotometria no *NanoDrop 2000c®* (*Thermo Fisher Scientific*, Wilmington,

DE, EUA). A absorbância no comprimento de onda de 260 nm foi utilizada para determinar a concentração de ácidos nucleicos, e a razão para determinar o grau de pureza em relação a proteínas foi obtida entre as absorbâncias 260 e 280nm.

3.3 GENOTIPAGEM DO *TGFB1* POR PCR-RFLP

A análise dos polimorfismos genéticos foi realizada por reações em cadeia da polimerase (PCR) seguidas de restrição enzimática, de acordo com a técnica descrita por Jin *et al.* (2004). Um segmento do gene *TGFB1* foi amplificado por PCR, que flanqueavam os polimorfismos da região promotora – rs1800468, G-800A e rs1800469, C-509T.

As concentrações dos reagentes utilizadas estão descritas na tabela 5. Para a amplificação dos polimorfismos da região promotora, as sequências dos oligonucleotídeos foram: 5'- GCA GTT GGC GAG AAC AGT TG 3' (*Primer Forward*) e 5'- CCA GAA CGG AAG GAG AGT CAG 3' (*Primer Reverse*). As condições de ciclagem da PCR encontram-se descritas na tabela 6.

Tabela 5 – Concentrações dos reagentes utilizados na reação.

Reagentes (concentração)	Concentração final
Buffer (10 X)*	1X
MgCl ₂ (50mM)*	1,0mM
dNTP (1,25mM)*	0,1mM
Primer Forward (2,5µM)*	0,20µM
Primer Reverse (2,5µM)*	0,20µM
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U/µL)*	1U
Água ultrapura (Mili-Q)	-
Amostra	~100ng
Total	-

*Invitrogen (Carlsbad,CA, EUA).

Tabela 6 – Condições utilizadas para a amplificação da região do gene *TGFB1*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	10min	1
Desnaturação	94°C	45s	
Hibridação	59°C	60s	35
Extensão	72°C	75s	
Extensão final	72°C	10min	1

A amplificação da PCR foi analisada por eletroforese em géis de poliacrilamida numa concentração de 10%, seguida de coloração por nitrato de prata (AgNO₃). Os fragmentos gerados foram então clivados por enzimas de restrição

(*New England Biolabs*®, Ipswich, MA, EUA), utilizando 1U da enzima para clivar 2µL e 4µL do produto de PCR para, respectivamente, os polimorfismos G-800A e C-509T em no mínimo 3 horas de incubação à 37°C, seguindo as recomendações do fabricante. Os fragmentos gerados pela restrição enzimática, novamente foram analisados por eletroforese em géis de poliacrilamida na concentração de 10%, seguida de coloração por AgNO₃.

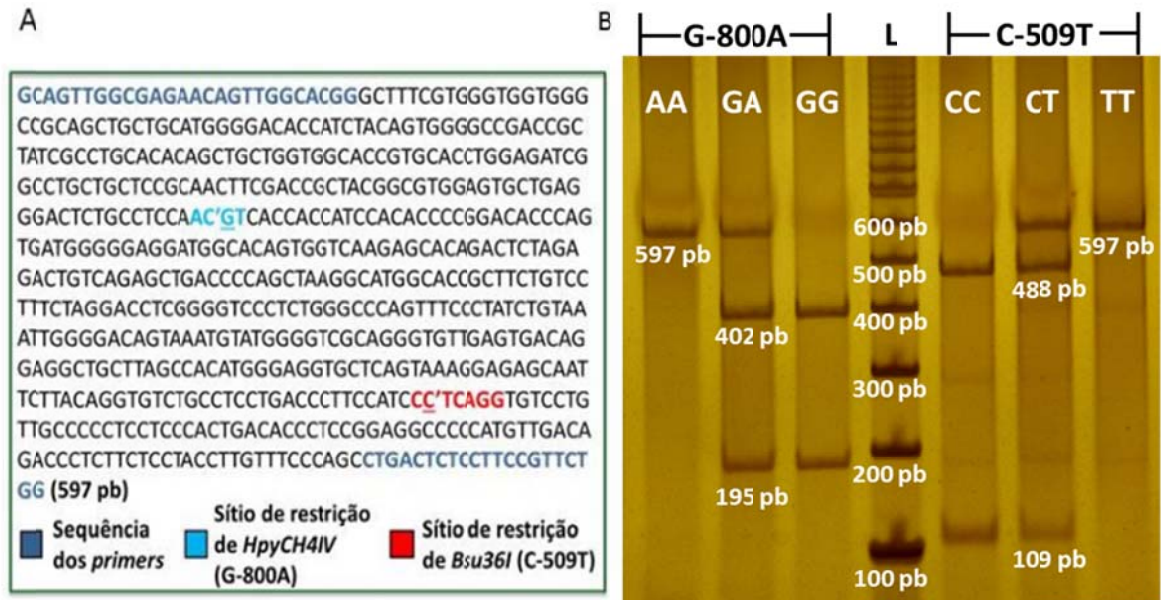
A enzima de restrição *HpyCH4IV* foi utilizada para determinar o polimorfismo G-800A. A substituição G>A elimina o sítio de restrição para esta enzima no fragmento amplificado. Resultante disso, a clivagem do alelo G gera dois fragmentos – 402 pb e 195 pb, enquanto o alelo A não sofre ação da enzima, mantendo o tamanho original de 597 pb.

Para análise do polimorfismo C-509T, foi utilizada a enzima *Bsu36I*, que reconhece o sítio de restrição no alelo C, gerando fragmentos de 488 pb e 109 pb. A substituição C>T elimina o sítio de restrição da clivagem, ou seja, o alelo T não sofre a ação da enzima, mantendo o tamanho de 597 pb.

A figura 2 ilustra o fragmento amplificado para a análise dos polimorfismos da região promotora do gene *TGFB1*, de acordo com os sítios de restrição das enzimas utilizadas e os nucleotídeos polimórficos, e os perfis de bandas para cada genótipo após a restrição enzimática.

Todas as reações de PCR foram realizadas com um controle negativo (sem adição de DNA) para garantir que não houvesse contaminação da reação com DNA exógeno.

Figura 2 – Análise dos polimorfismos da região promotora do gene *TGFB1*. A) Sequência e tamanho do fragmento da região promotora do gene *TGFB1* com os primers e as enzimas de restrição utilizadas para genotipagem; B) Perfil eletroforético dos polimorfismos da região promotora do gene *TGFB1*.



3.4 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DO TGFB1

A análise quantitativa dos níveis plasmáticos foi realizada pela técnica imunoenzimática chamada ELISA (do inglês: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utilizando *BD OptEIA™ Human TGFB1* (*BD Biosciences Pharmingen*, San Diego, EUA). Inicialmente, o plasma foi tratado pela adição de uma solução ácida, ácido clorídrico 1M. Após incubação a 4°C por 60 minutos, estas amostras foram neutralizadas pelo hidróxido de sódio (NaOH) 1M. Em seguida, o plasma de cada grupo foi adicionado em placas contendo anticorpo monoclonal anti-TGFB1 humano e incubado overnight à 8°C. As amostras foram lavadas, seguidas da adição de anticorpo secundário biotinilado *Horseradish peroxidase* conjugado com Streptavidina (HRV+SAV). Após a lavagem, foi adicionado o substrato da enzima peroxidase, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em uma solução cromogênica contendo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), seguida de ácido fosfórico (H₃PO₄) para interromper a reação. A leitura da placa de ELISA foi realizada no comprimento de onda de 450nm utilizando *ELX-300 Reader* (*BioTek Instruments Inc.*, VT, EUA).

Os resultados foram expressos em ng/ml para TGFB1, e todas as amostras foram analisadas em duplicata. O processamento dos dados foi realizado

usando uma curva de calibração, por meio do software *Gen5* (*BioTek Instruments Inc.*, VT, E.U.A).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em relação à análise estatística, as frequências dos genótipos dos polimorfismos foram submetidas a o teste do qui-quadrado para verificar o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Os estudos de associação do tipo caso-controle foram analisados pelo cálculo da *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) a 95% e por teste de *Fisher*. Já, os níveis plasmáticos foram analisados e comparados com genótipos pelo teste U de *Mann-Whitney*. Toda a análise estatística foi realizada usando o software *Prism 5* (*GraphPad Software*, San Diego, EUA).

REFERÊNCIAS

- ABDUL-HAMID, G. **Classification of Acute Leukemia**. 2011.
- ACS. American Cancer Society - Cancer in Children. 2016a.
- ACS. American Cancer Society - Leukemia - Acute Lymphocytic (Adults). 2016b.
- AGIRRE, X. et al. Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA Hsa-miR-124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Res**, v. 69, n. 10, p. 4443-53, May 15 2009.
- AKIYAMA, T. et al. Involvement of transforming growth factor-beta and thrombopoietin in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome with myelofibrosis. **Leukemia**, v. 19, n. 9, p. 1558-66, Sep 2005.
- AL-MOWALLAD, A. et al. Plasma CD105, TGFbeta-1, TGFbeta-3 and the ligand/receptor complexes in children with acute lymphoblastic leukaemia. **Anticancer Res**, v. 26, n. 1B, p. 543-7, Jan-Feb 2006.
- ALLEVA, D. G.; BURGER, C. J.; ELGERT, K. D. Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF-alpha production. Role of tumor-derived IL-10, TGF-beta, and prostaglandin E2. **J Immunol**, v. 153, n. 4, p. 1674-86, Aug 15 1994.
- ALMEIDA, T. J. B. Avanços e perspectivas para o diagnóstico da Leucemia Linfóide Aguda. **Candombá [Internet]**, p. 40-55, 2009.
- ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391-405, May 19 2016.
- ARMSTRONG, S. A.; LOOK, A. T. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 26, p. 6306-15, Sep 10 2005.
- AZIZDOOST, S. et al. Bone marrow neoplastic niche in leukemia. **Hematology**, v. 19, n. 4, p. 232-8, Jun 2014.
- BALASUBRAMANIAN, S. P. et al. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **Eur J Surg Oncol**, v. 30, n. 6, p. 593-601, Aug 2004.
- BELLOMO, C.; CAJA, L.; MOUSTAKAS, A. Transforming growth factor beta as regulator of cancer stemness and metastasis. **Br J Cancer**, v. 115, n. 7, p. 761-9, Sep 27 2016.
- BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. **Environ Health Perspect**, v. 115, n. 1, p. 138-45, Jan 2007.

BENE, M. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). **Leukemia**, v. 9, n. 10, p. 1783-1786, 1995.

BENE, M. C. et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. **Leukemia**, v. 25, n. 4, p. 567-74, Apr 2011.

BENNETT, J. M. et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **Br J Haematol**, v. 33, n. 4, p. 451-8, Aug 1976.

BENNETT, J. M. et al.. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. **Br J Haematol**, v. 47, n. 4, p. 553-61, Apr 1981.

BLANK, U.; KARLSSON, S. TGF-beta signaling in the control of hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 125, n. 23, p. 3542-50, Jun 04 2015.

BLOOMFIELD, C. D. et al. Chromosomal abnormalities identify high-risk and low-risk patients with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 67, n. 2, p. 415-20, Feb 1986.

BORIM, L. N. B. et al. Estado nutricional como fator prognóstico em crianças portadoras de Leucemia Linfocítica Aguda. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 1, 2000.

BOUCHIE, A. First microRNA mimic enters clinic. **Nat Biotechnol**, v. 31, n. 7, p. 577, Jul 2013.

BRANTON, M. H.; KOPP, J. B. TGF- β and fibrosis. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 15, p. 1349-1365, 1999.

CAMBIEN, F. et al. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. **Hypertension**, v. 28, n. 5, p. 881-7, Nov 1996.

CAMPANA, D.; PUI, C. H. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. **Blood**, v. 85, n. 6, p. 1416-34, Mar 15 1995.

CAZÉ, M. O.; BUENO, D.; SANTOS, M. E. F. D. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil. **Revista HCPA. Porto Alegre. Vol. 30, n. 1 (2010), p. 5-12, 2010.**

CHANG, H.; BROWN, C. W.; MATZUK, M. M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. **Endocr Rev**, v. 23, n. 6, p. 787-823, Dec 2002.

CHEIFETZ, S. et al. The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. **Cell**, v. 48, n. 3, p. 409-15, Feb 13 1987.

CHESELLES, J. M. et al. Continuing (maintenance) therapy in lymphoblastic leukaemia: lessons from MRC UKALL X. **Br J Haematol**, v. 98, n. 4, p. 945-951, 1997.

CHIARETTI, S.; ZINI, G.; BASSAN, R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. **Mediterr J Hematol Infect Dis**, v. 6, n. 1, p. e2014073, 2014.

CHOKKALINGAM, A. P. et al. Haplotypes of DNA repair and cell cycle control genes, X-ray exposure, and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Causes Control**, v. 22, n. 12, p. 1721-30, Dec 2011.

CHOKKALINGAM, A. P.; BUFFLER, P. A. Genetic susceptibility to childhood leukaemia. **Radiat Prot Dosimetry**, v. 132, n. 2, p. 119-29, 2008.

CIFTCI, R. et al. High serum transforming growth factor beta 1 (TGFB1) level predicts better survival in breast cancer. **Tumour Biol**, v. 35, n. 7, p. 6941-8, Jul 2014.

CORNACCHIONI, A. L. B. et al. Recidivas extramedulares em leucemia linfocítica aguda: impacto da quimioterapia e definição de um grupo particularmente favorável. **Pediatria (São Paulo)**, v. 26, n. 1, p. 27-33, 2004.

COUSTAN-SMITH, E. et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 2, p. 147-156, 2009.

CRAIG, F. E.; FOON, K. A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. **Blood**, v. 111, n. 8, p. 3941-67, Apr 15 2008.

DAI, L. et al. A case-control study of childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms in the TGF-beta and receptor genes. **Pediatr Blood Cancer**, v. 52, n. 7, p. 819-23, Jul 2009.

DE SOUZA REIS, R. et al. Early childhood leukemia incidence trends in Brazil. **Pediatr Hematol Oncol**, v. 33, n. 2, p. 83-93, Mar 2016.

DEATON, A. M.; BIRD, A. CpG islands and the regulation of transcription. **Genes Dev**, v. 25, n. 10, p. 1010-22, May 15 2011.

DEN BOER, M. L. et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. **Lancet Oncol**, v. 10, n. 2, p. 125-34, Feb 2009.

DERYNCK, R. et al. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. **Nature**, v. 316, n. 6030, p. 701-5, Aug 22-28 1985.

EASWARAN, H.; TSAI, H. C.; BAYLIN, S. B. Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. **Mol Cell**, v. 54, n. 5, p. 716-27, Jun 5 2014.

EL-HEFNI, A. M.; AZZAZI, N. A.; SHARAF, S. M. Prognostic Utility of Transforming Growth Factor Beta-1 in Diffuse Large Cell Non-Hodgkin Lymphoma. **Journal of Hematology**, v. 4, n. 1, p. 131-136, 2015.

FARHI, D. C.; ROSENTHAL, N. S. Acute lymphoblastic leukemia. **Clinics in laboratory medicine**, v. 20, n. 1, p. 17-28, vii, 2000.

FARIAS, M. G.; CASTRO, S. M. D. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 2, p. 91-98, 2004.

FERRI, F. F. **Ferri's Clinical Advisor 2013, 5 Books in 1, Expert Consult-Online and Print, 1: Ferri's Clinical Advisor 2013**. Elsevier Health Sciences, 2012.

GALLEGOS-ARREOLA, M. P. et al. Pathophysiology of Acute Lymphoblastic Leukemia. 2013.

GRAINGER, D. J. et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. **Hum Mol Genet**, v. 8, n. 1, p. 93-7, Jan 1999.

GREAVES, M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 3, p. 193-203, Mar 2006.

GREAVES, M. F.; WIEMELS, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 9, p. 639-49, Sep 2003.

GROTENDORST, G. R.; SMALE, G.; PENCEV, D. Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. **J Cell Physiol**, v. 140, n. 2, p. 396-402, Aug 1989.

GUR, H. et al. Rheumatic manifestations preceding adult acute leukemia: characteristics and implication in course and prognosis. **Acta Haematol**, v. 101, n. 1, p. 1-6, Mar 1999.

HAMERSCHLAK, N. Leukemia: genetics and prognostic factors. **J Pediatr (Rio J)**, v. 0, n. 0, 2008.

HARBOTT, J. et al. Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. **Blood**, v. 90, n. 12, p. 4933-7, Dec 15 1997.

HARRISON, C. J. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, v. 144, n. 2, p. 147-56, Jan 2009.

HARRISON, C. J. et al. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. **Leukemia**, v. 28, n. 5, p. 1015-21, May 2014.

HASHIBE, M. et al. Epidemiologic review of marijuana use and cancer risk. **Alcohol**, v. 35, n. 3, p. 265-275, 2005.

HAYES, J.; PERUZZI, P. P.; LAWLER, S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. **Trends Mol Med**, v. 20, n. 8, p. 460-9, Aug 2014.

HEALY, J.; ROY-GAGNON, M. H.; SINNETT, D. No evidence for association between TGFB1 promoter SNPs and the risk of childhood pre-B acute lymphoblastic leukemia among French Canadians. **Haematologica**, v. 94, n. 7, p. 1034-5, Jul 2009.

IKEUTI, P. S.; BORIM, L. N. B.; LUPORINI, R. L. Dor óssea e sua relação na apresentação inicial da leucemia linfóide aguda. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 1, 2006.

INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v. 381, n. 9881, p. 1943-55, Jun 1 2013.

INCA. Leucemias agudas na infância e adolescência. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 245-57, 2001.

INCA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. p. 122, 2015b.

INFANTE-RIVARD, C. et al. Risk of childhood leukemia associated with exposure to pesticides and with gene polymorphisms. **Epidemiology**, v. 10, n. 5, p. 481-7, Sep 1999.

IVANOVIC, V. et al. Elevated plasma levels of TGF-beta 1 in patients with invasive prostate cancer. **Nat Med**, v. 1, n. 4, p. 282-4, Apr 1995.

JABBOUR, E. et al. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 121, n. 15, p. 2517-28, Aug 1 2015.

JIN, M. W. et al. A review of risk factors for childhood leukemia. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 20, n. 18, p. 3760-3764, Sep 2016.

JIN, Q. et al. Polymorphisms and haplotype structures in genes for transforming growth factor beta1 and its receptors in familial and unselected breast cancers. **Int J Cancer**, v. 112, n. 1, p. 94-9, Oct 20 2004.

JOHANSSON, B.; MERTENS, F.; MITELMAN, F. Clinical and biological importance of cytogenetic abnormalities in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia. **Ann Med**, v. 36, n. 7, p. 492-503, 2004.

- JUNKER, U. et al. Transforming growth factor beta 1 is significantly elevated in plasma of patients suffering from renal cell carcinoma. **Cytokine**, v. 8, n. 10, p. 794-8, Oct 1996.
- KAMPS, W. A. et al. Long-term follow-up of Dutch Childhood Leukemia Study Group (DCLSG) protocols for children with acute lymphoblastic leukemia, 1984-1991. **Leukemia**, v. 14, n. 12, p. 2240-6, Dec 2000.
- KANG, H. G. et al. Polymorphisms in TGF-beta1 gene and the risk of lung cancer. **Lung Cancer**, v. 52, n. 1, p. 1-7, Apr 2006.
- KAUSHANSKY, K. et al. Williams Hematology. v. 9ed, p. 2528, 2016.
- KIKUCHI, K. et al. Genetic polymorphisms of transforming growth factor beta-1 promoter and primary biliary cirrhosis in Japanese patients. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1110, p. 15-22, Sep 2007.
- KIM, S. J.; LETTERIO, J. Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis. **Leukemia**, v. 17, n. 9, p. 1731-7, Sep 2003.
- KONG, F. M. et al. Elevated plasma transforming growth factor-beta 1 levels in breast cancer patients decrease after surgical removal of the tumor. **Ann Surg**, v. 222, n. 2, p. 155-62, Aug 1995.
- KONOPLEVA, M. Y.; JORDAN, C. T. Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 5, p. 591-9, Feb 10 2011.
- KUBICZKOVA, L. et al. TGF-beta - an excellent servant but a bad master. **J Transl Med**, v. 10, p. 183, Sep 03 2012.
- KUBISTOVA, Z.; MRAZEK, F.; PETREK, M. Polymorphisms of the immune response genes: selected biological, methodical and medical aspects. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 153, n. 2, p. 93-102, Jun 2009.
- KUROKAWA, M. et al. The oncoprotein Evi-1 represses TGF-beta signalling by inhibiting Smad3. **Nature**, v. 394, n. 6688, p. 92-6, Jul 02 1998.
- KYRTSONIS, M.-C. et al. Serum transforming growth factor-I is related to the degree of immunoparesis in patients with multiple myeloma. **Medical Oncology**, v. 15, p. 124-128, 1998.
- LAI, R.; HIRSCH-GINSBERG, C. F.; BUESO-RAMOS, C. Pathologic diagnosis of acute lymphocytic leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 14, n. 6, p. 1209-35, Dec 2000.
- LARSON, R. A.; ANASTASI, J. Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical Presentation, Diagnosis, and Classification. p. 109-118, 2008.
- LILLEYMAN, J. S. et al. Cytomorphology of childhood lymphoblastic leukaemia: a prospective study of 2000 patients. **Br J Haematol**, v. 81, n. 1, p. 52-57, 1992.

LIU, Y. et al. Transforming Growth Factor Beta-1 C-509T Polymorphism and Cancer Risk: A Meta-analysis of 55 Case-control Studies. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 9, p. 4683-4688, 2012.

LIU, Y.; ZHOU, W.; ZHONG, D. W. Meta-analyses of the associations between four common TGF-beta1 genetic polymorphisms and risk of colorectal tumor. **Tumour Biol**, v. 33, n. 4, p. 1191-9, Aug 2012.

LOCATELLI, F. et al. How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 120, n. 14, p. 2807-16, Oct 04 2012.

LODISH, H. et al. Molecular cell biology. **Chap**, v. 4, p. 120, 2000.

LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2006. 710.

LUDWIG, W. D.; HAFERLACH, C.; SCHOCH, C. Classification of Acute Leukemias. **Current Clinical Oncology**, p. 3-41, 2003.

MA, J. et al. TGF- β 1 polymorphism 509 C> T is associated with an increased risk for hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 4461-4468, 2015.

MAEDA, H. et al. TGF-beta enhances macrophage ability to produce IL-10 in normal and tumor-bearing mice. **J Immunol**, v. 155, n. 10, p. 4926-32, Nov 15 1995.

MANDELLI, F.; ANNINO, L.; ROTOLI, B. The GIMEMA ALL 0183 trial: analysis of 10-year follow-up. **Br J Haematol**, v. 92, n. 3, p. 665-672, 1996.

MANISHA, P. Leukemia: a review article. **International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical & Bio Sciences**, v. 1, n. 4, p. 397-408, 2012.

MATHÉ, G.; RAPPAPORT, H. **Histological and cytological typing of neoplastic diseases of haematopoietic and lymphoid tissues**. World Health Organization, 1976.

MCKENNA, R. W. Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. **Blood**, v. 98, n. 8, p. 2498-2507, 2001.

MEDEIROS, G. E. B. et al. Acompanhamento do Perfil Hematológico de Pacientes Portadores de Leucemia Linfóide Aguda (LLA) Tratados pelo Protocolo GBTLI LLA-93. **NewsLab**, v. 15, p. 11-12, 2004.

METAYER, C. et al. Tobacco smoke exposure and the risk of childhood acute lymphoblastic and myeloid leukemias by cytogenetic subtype. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 22, n. 9, p. 1600-11, Sep 2013.

MILLER, D. R. et al. Prognostic Importance of Morphology (FAB Classification) in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL). **Br J Haematol**, v. 48, n. 2, p. 199-206, 1981.

MITTELMAN, F. The Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia. Lund, Sweden, July 21-25, 1980. Introduction. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 4, n. 2, p. 96-98, 1981.

MITTL, P. R. et al. The crystal structure of TGF-beta 3 and comparison to TGF-beta 2: implications for receptor binding. **Protein Sci**, v. 5, n. 7, p. 1261-71, Jul 1996.

MROZEK, K.; HARPER, D. P.; APLAN, P. D. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 23, n. 5, p. 991-1010, v, Oct 2009.

MULLIGHAN, C. G. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2012, p. 389-96, 2012.

MULLIGHAN, C. G.; DOWNING, J. R. Genome-wide profiling of genetic alterations in acute lymphoblastic leukemia: recent insights and future directions. **Leukemia**, v. 23, n. 7, p. 1209-1218, 2009.

MULLIGHAN, C. G. et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 360, n. 5, p. 470-80, Jan 29 2009.

NEUMANN, M. et al. FLT3 mutations in early T-cell precursor ALL characterize a stem cell like leukemia and imply the clinical use of tyrosine kinase inhibitors. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53190, 2013.

NEUMANN, M. et al. Whole-exome sequencing in adult ETP-ALL reveals a high rate of DNMT3A mutations. **Blood**, v. 121, n. 23, p. 4749-52, Jun 6 2013.

NIU, W. et al. Association of TGFB1-509 C> T polymorphism with breast cancer: evidence from a meta-analysis involving 23,579 subjects. **Breast cancer research and treatment**, v. 124, n. 1, p. 243-249, 2010.

NORDLUND, J. et al. DNA methylation-based subtype prediction for pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Clin Epigenetics**, v. 7, p. 11, 2015.

OLDE NORDKAMP, L. et al. Karyotyping, FISH, and PCR in acute lymphoblastic leukemia: competing or complementary diagnostics? **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 31, n. 12, p. 930-5, Dec 2009.

ORFAO, A. et al. Immunophenotyping of acute leukemias and myelodysplastic syndromes. **Cytometry A**, v. 58, n. 1, p. 62-71, Mar 2004.

OUESLATI, S. et al. Association of TGFB1 -509C/T polymorphism gene with clinical variability in cystic fibrosis patients: A case-control study. **Pathol Biol (Paris)**, v. 63, n. 4-5, p. 175-8, Sep 2015.

PAINE, S. K. et al. Association of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor beta, and interferon gamma gene polymorphisms with proliferative diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes. **Mol Vis**, v. 18, p. 2749-57, 2012.

PAPAGEORGIS, P.; STYLIANOPOULOS, T. Role of TGFbeta in regulation of the tumor microenvironment and drug delivery (review). **Int J Oncol**, v. 46, n. 3, p. 933-43, Mar 2015.

PARVIZI, S. et al. Effects of Two Common Promoter Polymorphisms of Transforming Growth Factor-beta1 on Breast Cancer Risks in Ahvaz, West South of Iran. **Iran J Cancer Prev**, v. 9, n. 1, p. e5266, Feb 2016.

PICKUP, M.; NOVITSKIY, S.; MOSES, H. L. The roles of TGFbeta in the tumour microenvironment. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 11, p. 788-99, Nov 2013.

POLYCHRONAKIS, I. et al. Work-related leukemia: a systematic review. **J Occup Med Toxicol**, v. 8, n. 1, p. 14, 2013.

PUI, C.-H.; ROBISON, L. L.; LOOK, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v. 371, n. 9617, p. 1030-1043, 2008.

PUI, C. H.; CAMPANA, D. New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 14, n. 5, p. 783-5, May 2000.

PUI, C. H.; RELLING, M. V.; DOWNING, J. R. Acute lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 350, n. 15, p. 1535-48, Apr 8 2004.

PUI, C. H. et al. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 118-45, 2004.

REGO, E. M.; SANTOS, G. A. S. Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das pancitopenias e das linfocitoses. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 5, p. 367-374, 2009.

ROUCE, R. H. et al. The TGF-beta/SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B-acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 30, n. 4, p. 800-11, Apr 2016.

SCHMIEGELOW, K. et al. Risk of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is related to RBC methotrexate and mercaptopurine metabolites during maintenance chemotherapy. Nordic Society for Pediatric Hematology and Oncology. **J Clin Oncol**, v. 13, n. 2, p. 345-51, Feb 1995.

SHIRAI, Y. et al. Plasma transforming growth factor- β 1 in patients with hepatocellular carcinoma. Comparison with chronic liver diseases. **Cancer**, v. 73, n. 9, p. 2275-2279, 1994.

SICA, A. et al. Macrophage polarization in tumour progression. **Semin Cancer Biol**, v. 18, n. 5, p. 349-55, Oct 2008.

SILVERMAN, E. S. et al. Transforming growth factor-beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 169, n. 2, p. 214-9, Jan 15 2004.

SINNREICH, O. et al. Plasma levels of transforming growth factor-1beta and alpha2-macroglobulin before and after radical prostatectomy: association to clinicopathological parameters. **Prostate**, v. 61, n. 3, p. 201-8, Nov 01 2004.

STAHLHUT, C.; SLACK, F. J. MicroRNAs and the cancer phenotype: profiling, signatures and clinical implications. **Genome Med**, v. 5, n. 12, p. 111, 2013.

SYED, V. TGF-beta Signaling in Cancer. **J Cell Biochem**, v. 117, n. 6, p. 1279-87, Jun 2016.

SYRRIS, P. et al. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms and coronary artery disease. **Clin Sci (Lond)**, v. 95, n. 6, p. 659-67, Dec 1998.

SYUKRI, M. et al. The promoter region (G-800A and C-509T) polymorphisms of transforming growth factor- β 1 gene among young women with recurrent urinary tract infection. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 15, n. 2, p. 125-130, 2014.

TAMIZIFAR, B. et al. Polymorphism of the promoter region of C-509T of transforming growth factor-beta1 gene and ulcerative colitis. **Arch Iran Med**, v. 10, n. 2, p. 171-5, Apr 2007.

TODOROVIĆ-RAKOVIĆ, N. et al. Elevated plasma levels of tgf-beta1 in patients with locally advanced breast cancer related to other clinical stages. **Archive of Oncology**, v. 11, n. 3, p. 131-133, 2003.

URAYAMA, K. Y. et al. Current evidence for an inherited genetic basis of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Int J Hematol**, v. 97, n. 1, p. 3-19, Jan 2013.

URBAŃSKA - RYŚ, H.; WIERZBOWSKA, A.; ROBAK, T. Circulating angiogenic cytokines in multiple myeloma and related disorders. **European cytokine network**, v. 14, n. 1, p. 40-51, 2003.

VARDIMAN, J. W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937-51, Jul 30 2009.

VERAS, G.; ARAGÃO, V. M. D. F.; SANTOS, A. M. D. Leucemia linfoblástica aguda em São Luís. Aspectos clínicos e terapêuticos. **Rev. Bras. Med**, v. 69, n. 7, p. 173-181, 2012.

VERRASTRO, T. Hematologia e hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica. In: (Ed.). **Hematologia e hemoterapia: fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica**: Atheneu, 2005.

VIGNALI, D. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 7, p. 523-32, Jul 2008.

WAN, P. Q. et al. TGF-beta1 polymorphisms and familial aggregation of liver cancer in Guangxi, China. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 3, p. 8147-60, Jul 27 2015.

WANG, X. R. et al. [Relationship of TGF- β and IL-4R gene polymorphisms with risk of classical Hodgkin lymphoma]. **Chinese Journal Hematology**, v. 33, n. 12, p. 1015-1019, 2012.

WIEMELS, J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. **Chem Biol Interact**, v. 196, n. 3, p. 59-67, Apr 5 2012.

WONG, N. C. et al. A distinct DNA methylation signature defines pediatric pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. **Epigenetics**, v. 7, n. 6, p. 535-41, Jun 1 2012.

YAMAZAKI, S. et al. Nonmyelinating Schwann Cells Maintain Hematopoietic Stem Cell Hibernation in the Bone Marrow Niche. **Cell**, v. 147, n. 5, p. 1146-1158, 2011.

YEH, C. H.; MOLES, R.; NICOT, C. Clinical significance of microRNAs in chronic and acute human leukemia. **Mol Cancer**, v. 15, n. 1, p. 37, May 14 2016.

ZHANG, C. et al. Histone acetylation: novel target for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Clin Epigenetics**, v. 7, p. 117, 2015.

ZHANG, J. et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, v. 481, n. 7380, p. 157-63, Jan 11 2012.

ZHAO, J. et al. Clinical and prognostic significance of serum transforming growth factor-beta1 levels in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. **Braz J Med Biol Res**, v. 49, n. 8, Jul 25 2016.

ZHAO, M. et al. Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. **Nature Medicine**, v. 20, n. 11, p. 1321-1326, 2014.

4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Chemotherapy modulate plasma concentration of TGFB1 cytokine in ALL
independent of promoter region genetic polymorphism

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant hematologic disorder and the most common cancer in children between 2 and 5 years old. The transforming growth factor Beta (TGFB) is involved in several physiological and pathological conditions, and its functions in hematopoietic system-bone marrow axis may be impaired in ALL. Genetic polymorphisms in the promoter region of *TGFB1* gene have been associated to TGFB1 altered expression and may be involved with disease susceptibility and/or prognosis. In this study, a case-control study of two polymorphisms in the *TGFB1* promoter region (rs1800468 and rs1800469) and TGFB1 plasma levels were evaluated in view of a possible functional correlation among polymorphisms and protein levels. Furthermore, it was investigated its possible involvement in different clinical stages of ALL. The study consisted of 104 childhood patients with ALL and 115 controls. Both polymorphisms were not associated with ALL susceptibility or risk of relapse, and their different genotypes did not influence TGFB1 plasma levels. However, TGFB1 concentration in ALL (mean 8.38ng/mL \pm 1.13) patients were significantly lower when compared with control group (15.58ng/mL \pm 1.22; $p < 0.0001$). TGFB1 plasma levels were significantly lower in patients with ALL at diagnosis, compared with treatment ($p = 0.008$) and remission ($p < 0.0001$) groups. Notably, patients in remission presented similar TGFB1 plasma levels to controls. This study demonstrates the effects of a deregulated immune function in childhood ALL concerning to TGFB1 when predicting prognosis, and indicates a potential TGFB1 regulation induced by ALL treatment.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia, TGFB1, genetic polymorphism, chemotherapy.

INTRODUCTION

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant hematologic disorder and the most common cancer in children between 2 and 5 years old, although it occurs in adulthood less frequently. Although the etiology remains unknown, it has been revealed that exogenous and endogenous exposures might result in ALL's pathogenesis (Inaba *et al.*, 2013). In Brazil, the National Cancer Institute (INCA) has estimated 10,070 new cases of leukemia in 2016 (INCA, 2015a).

Chemotherapy constitutes the basis for ALL treatment, however it negatively influences immune system, potentially allowing life threatening opportunistic infections. In fact, immunological impairment persists in leukemia patients for the whole treatment period and after its completion (El-Chennawi *et al.*, 2008). In this setting, the relation between immune system and tumor immunity has becoming a relevant issue due to the fact that cells and cytokines secretion are involved in modulation of tumor microenvironment (Kerkar and Restifo, 2012; Gajewski *et al.*, 2013).

The transforming growth factor beta (TGFB) family constitutes a multifunctional set of cytokines that regulate a bewildering array of cellular processes during development and beyond. In this regard, TGFB is considered a multi-faceted cytokine with opposite functions at the initial and late stages of cancer. Furthermore, this cytokine has demonstrated many functions, including immunoregulation (Johnston *et al.*, 2016), regulation of tumor microenvironment (Pickup *et al.*, 2013) and modulation of hematopoietic system-bone marrow axis (Blank and Karlsson, 2015).

Mutations involving TGFB signaling pathway genes are relatively uncommon in hematologic malignancies (Kim and Letterio, 2003). However, a few reports have demonstrated the involvement of SMAD3 deficiency in T cell ALL (Wolfrain *et al.*, 2004), and mutations in TGFB receptors 1 and 2 genes (*TGFBR1* and *TGFBR2*) in T cell lymphoma (Knaus *et al.*, 1996; Schiemann *et al.*, 1999).

It is known that genetic polymorphisms or sequence variants are commonly distributed throughout human genome, and may be associated with disease susceptibility and/or prognosis. On the basis of this assumption, the functional impact of a polymorphism can alter gene function, and could predict the likelihood of association of a given condition (Albert, 2011).

Polymorphisms in the promoter region of *TGFB1* gene have been particularly associated to TGFB impaired expression (Shah *et al.*, 2006). Two of them, rs1800468 and rs1800469, located at -800 and -509 position from start codon, result in G>A and C>T alleles, respectively. However, their effects on the function of *TGFB1* gene remain unclear.

In this study, we performed a case-control study by genotyping two polymorphisms in the *TGFB1* promoter region (rs1800468 and rs1800469) and determined TGFB1 plasma levels to evaluate a possible functional correlation among the two polymorphisms and protein levels. Also, we investigated its possible involvement in different clinical stages (diagnosis, treatment and remission) of ALL.

MATERIALS AND METHODS

2.1 Study population

The study protocol was reviewed and approved by the ethics committee of Londrina State University (CAAE N°. 17123113.4.0000.5231). Written informed consent was obtained from all study subjects (children's parents). Peripheral blood 5 mL was collected from 104 patients (52 males and 52 females) (mean age 8.6 years) with ALL diagnosis, attended in the Londrina Cancer Hospital (LCH) and University Hospital (UH) of Londrina State University, Paraná, Brazil. Patient's diagnosis were based on the guidelines from the division of Hematology/Oncology of UH and LCH; risk of relapse was classified based on GBTLI Protocol (Brazilian Treatment Group for Leukemias in Childhood Protocol – 2009). At the same time, blood samples of 115 individuals (53 males and 62 females) (mean age 10.9) without cancer or inflammatory diseases (based on hematological, biochemical and serological tests) were collected in UH and included as a control group.

2.2 Genomic DNA extraction

Genomic DNA was extracted from whole blood using Biopur Mini Spin Plus Kit (Biometrix Diagnostica, Curitiba, Brazil), according to manufacturer's instructions. DNA was eluted in 50 µL of buffer and quantified by NanoDrop 2000c® Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA), at wavelength of 260/280 to indicate DNA concentration and purity.

2.3 *TGFB1* genotyping

Two polymorphisms in the *TGFB1* promoter region (rs1800468 and rs1800469) were evaluated using polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Samples were amplified in a final volume of 25 μ L containing 100 ng/ μ L DNA template, 200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, 1.25 mM dNTP, 50 mM MgCl₂, 5 U/ μ L *Taq* DNA Polymerase and 2.5 μ M of each primer (forward 5' GCA GTT GGC GAG AAC AGT TG 3'; reverse 5' CCA GAA CGG AAG GAG AGT CAG), which were described by Jin *et al.* (2004).

PCR conditions were: denaturation at 94°C for 10 min, 35 cycles of 94°C for 45s, 59°C for 60s, 72°C for 75s and a final extension at 72°C for 10 min. PCR products were digested using one unit of two restriction enzymes: *HpyCH4IV* and *Bsu36I* (New England Biolabs Inc, Ipswich, USA) at 37°C for 3h, and generated two different genotypic profiles. *HpyCH4IV* cleaves the G allele from rs1800468, generating 402 bp and 195 bp fragments. The genotypes were scored as homozygous wild type (402 bp and 195 bp), heterozygous (597 bp, 402 bp and 195 bp), and mutant homozygous (597 bp, no restriction site). Moreover, *Bsu36I* cleaves C allele from rs1800469, generating 488 bp and 109 bp fragments. The genotypes were scored as homozygous wild type (488 bp and 109 bp), heterozygous (597 pb, 488 bp and 109 bp) and mutant homozygous (597 bp, no restriction site). PCR products were analyzed on polyacrylamide gel (10%), stained with silver nitrate (AgNO₃). Restriction conditions followed the manufacturer's protocol.

2.4 Plasma *TGFB1* quantification

TGFB1 was quantified in blood plasma using BD OptEIA™ Human *TGFB1* Set (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA). Plasma latent *TGFB1* was activated (pH) and then added into plates precoated with anti-human *TGFB1* monoclonal antibody and incubated overnight at 8°C. The samples were washed, and biotinylated secondary antibody-HRP+SAV conjugated was added. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) Peroxidase substrate were added after wash, followed by 1M Phosphoric acid for stop solution. The ELISA plate was read at 450 nm wavelength using ELX-300 Reader (BioTek Instruments Inc., VT, USA). The results were expressed in ng/ml for *TGFB1*. Each experimental and control sample was assayed in two biological replicates. Data processing was performed using the analytical curve-fitting software Gen5 (BioTek).

2.5 Statistical analysis

Genotype frequencies were submitted to chi-square test to detect deviations from Hardy-Weinberg equilibrium. Case control association study was performed using contingency tables to calculate the Odds Ratio (OR), with 95% confidence interval (CI), and *Fisher* exact tests. Cytokine levels were analyzed using non-parametric Mann-Whitney U test. Statistical analysis was performed using Prism 6 for Windows software (GraphPad Software, San Diego, USA). Probability values (p) < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Risk of relapse status was determined by a hematologist–oncologist (Trigo, FC) and the ALL classification included age and leukocyte count at diagnosis, immunophenotyping, involvement of tissues other than bone marrow and responsiveness to treatment. According to this, 31 patients were classified as low risk and 73 as high risk of relapse. In addition, most of our sample, both patients and controls, were predominantly Caucasian, a prevalent population in southern Brazil due to European colonization.

The controls and patients with ALL were both in Hardy–Weinberg equilibrium for the rs1800468 ($p=0.35$) and rs1800469 polymorphisms ($p=0.45$). Allele frequencies and genotypes are summarized at Table 1. There were no significant differences between patients with ALL and controls, comparing allele, genotypes and allele carrier frequencies. In addition, genotypes were compared regarding risk of relapse status of ALL (Table 2); however, no associations were found.

Table 1. Allele and genotype frequencies of the rs1800468 and rs1800469 polymorphisms in patients with ALL and controls.

SNPs	Allele/Genotype	ALL	Control	OR (CI 95%)	p value ^a
		N(%)	N (%)		
<i>Allele frequency</i>					
rs1800468	G	198 (95.19%)	219 (95.22%)	1.01 (0.42-2.42)	1.00
	A	10 (4.81%)	11 (4.78%)		
rs1800469	C	127 (61.06%)	145 (63%)	1.11 (0.75-1.63)	0.62
	T	81 (38.94%)	85 (37%)		
<i>Genotypes</i>					
rs1800468	GG	94 (90.38%)	106 (92.17%)	1.61 (0.56-4.40)	0.45
	GA	10 (9.62%)	7 (6.09%)		
	AA	0 (0)	2 (1.74%)		
rs1800469	CC	39 (37.5%)	43 (37.4%)	1.39 (0.59-3.25)	0.52
	CT	49 (47.12%)	59 (51.3%)		
	TT	16 (15.38%)	13 (11.3%)		
<i>Allele carrier</i>					
rs1800468	GG	94 (90.38%)	106 (92.17%)	1.25 (0.49-3.22)	0.81
	GA+AA	10 (9.62%)	9 (7.83%)		
rs1800469	CC	39 (37.5%)	43 (37.4%)	1.00 (0.56-1.72)	1.00
	CT+TT	65 (62.5%)	72 (62.6%)		

ALL: Acute lymphoblastic leukemia; OR: Odds ratio; CI: confidence interval; ^a Fisher's exact test.

Table 2. Risk association analysis between *TGFB1* rs1800468 and rs1800469 genotypes and ALL risk of relapse.

Groups	Genotypes	OR (CI 95%)		p value ^a	
		N (%)	N (%)		
rs1800468		AA+GA	GG	1.65 (0.43-6.33)	0.48
	Low risk	4 (3.85%)	27 (25.96%)		
	High risk	6 (5.77%)	67 (64.42%)		
rs1800469		TT+CT	CC	1.38 (0.57-3.36)	0.51
	Low risk	21 (20.19%)	10 (9.62%)		
	High risk	44 (42.31%)	29 (27.88%)		
		TT	CC+CT	1.51 (0.50-4.60)	0.55
	Low risk	6 (5.77%)	25 (24.04%)		
	High risk	10 (9.61%)	63 (60.58%)		

OR: odds ratio; CI: confidence interval; ^a Fisher's exact test.

TGFB1 concentration was determined on blood plasma and revealed that, overall, patients with ALL presented significantly lower levels of plasma TGFB1 (mean 8.38 ng/mL \pm 1.13) compared to control group (15.58 ng/mL \pm 1.22; $p < 0.0001$) (Figure 1). Moreover, TGFB1 plasma levels were compared between genotypes of *TGFB1* (rs1800468 and rs1800469) polymorphisms, but revealed no differences (Figure 2).

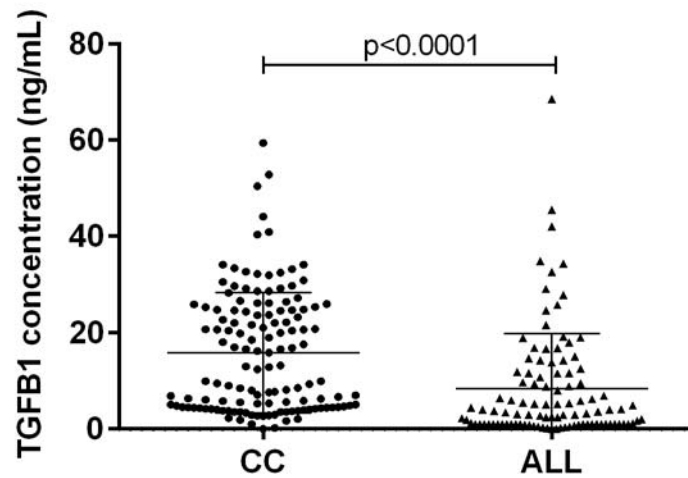


Figure 1. TGFB1 plasma levels in controls (CC) and patients with ALL. S.E.M. as error bars. Patients with ALL group: mean 8.38 ng/mL \pm 1.13; and control group 15.58 ng/mL \pm 1.22; $p < 0.0001$.

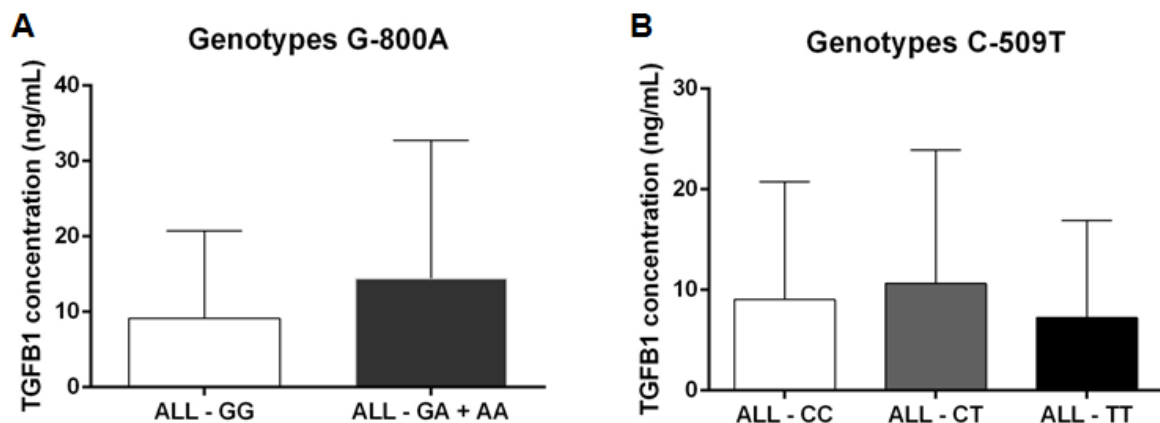


Figure 2. TGFB1 plasma levels in patients with ALL in rs1800468 (A) and rs1800469 (B) genotypes. S.E.M. as error bars. A) ALL – GG group: mean 9.13 ng/mL \pm 1.36; and ALL – GA+AA group: mean 14.41 ng/mL \pm 8.19; $p = 0.76$; B) ALL – CC group: mean 9.04 ng/mL \pm 2.29; ALL – CT: mean 10.63 ng/mL \pm 2.15; $p = 0.53$; and ALL – TT group: mean 7.24 ng/mL \pm 2.68; $p = 0.36$.

TGFB1 plasma levels were also compared in patients with ALL based on therapeutic regimen (Figure 2) at time of sampling: 25 of the patients were newly diagnosed (Diagnosis group); 48 were receiving chemotherapy (Treatment group), and 17 of them were in complete remission but receiving low-dose maintenance

chemotherapy (Remission group). Interestingly, in the analysis of chemotherapy effect, TGFB1 plasma levels were significantly lower in diagnosis group (mean 2.78 ng/mL \pm 0.89), comparing to treatment (8.09 ng/mL \pm 1.69; $p=0.008$) and remission (16.53 ng/mL \pm 2.85; $p<0.0001$) groups. Notwithstanding, plasma levels of TGFB1 in the remission group were compared to control group ($p=0.95$).

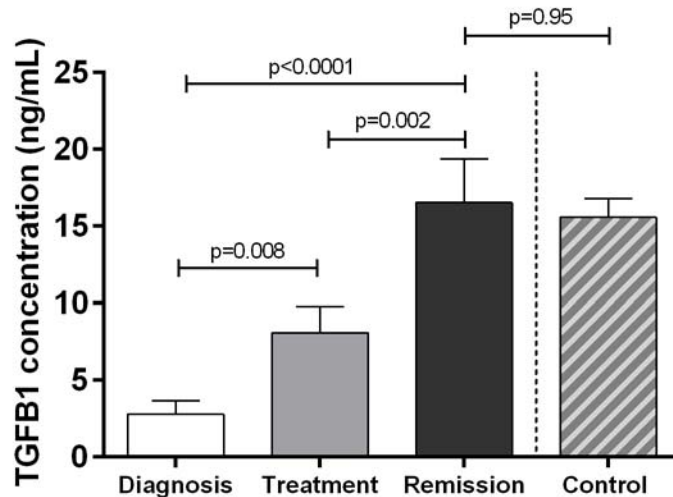


Figure 3. TGFB1 plasma levels in patients with ALL, according to clinical phases. S.E.M. as error bars. Diagnosis group: mean 2.78 ng/mL \pm 0.89; treatment group (8.09 ng/mL \pm 1.69; $p=0.008$); and remission group (16.53 ng/mL \pm 2.85; $p<0.0001$); control group (15.58 ng/mL \pm 1.22; $p=0.95$).

DISCUSSION

TGFB1 is considered as pleiotropic cytokine, regulating cell cycle, differentiation, proliferation, recognition and apoptosis (Shi and Massague, 2003) in virtually all tissues of the body, including hematopoietic (Karlsson *et al.*, 2007; Vaidya and Kale, 2015). Particularly in the last, TGFB1 controls quiescence and self-renewal of hematopoietic stem cells, processes that are disrupted in leukemic cells (Blank and Karlsson, 2015). Regardless of its multifunctional feature, genetic polymorphisms could interfere in *TGFB1* expression, thus, affecting its downstream signaling pathways. For this reason, the rs1800468 and rs1800469 polymorphisms, two gene variants in the promoter region *TGFB1* that can predict risk and/or clinical outcome in patients with ALL were under investigation.

To date, there are few studies comparing allele and genotype frequencies of these polymorphisms in patients with ALL. Dai *et al.* (2009) have demonstrated no associations of genotypes and allelic frequencies of thirteen *TGFB1* and *TGFBR2* polymorphisms in German patients with ALL. Likewise, Healy *et al.* (2009) reported no significant association of rs1800469 *TGFB1* polymorphism in French Canadian patients with pre-B ALL.

In line with this, we did not find significant differences in genotype distribution and allelic frequencies of promoter region *TGFB1* polymorphisms rs1800468 and rs1800469 among patients with ALL and controls. Furthermore, neither allelic or genotypic frequencies were associated to ALL risk of relapse. Thus, it is reasonable to assume that such polymorphisms in *TGFB1* promoter region may not represent good predictive biomarkers of ALL susceptibility or recurrence.

On the other hand, the impact of these gene polymorphisms in *TGFB1* expression have been questioned. The rs1800469 polymorphism is located in a consensus sequence of *TGFB1* promoter recognized by Yin Yang 1 (YY1) transcription factor, and the substitution of cytosine (C) to thymine (T) increases the YY1 affinity to the site (Silverman *et al.*, 2004), increasing cytokine circulating concentration. Contrariwise, the rs1800468 polymorphism is positioned in a putative site for cAMP-response element binding factor (CREB) family of transcription activators, and the A allele may decrease CREB members affinity to the site (Grainger *et al.*, 1999).

In the present study, TGFB1 was quantified in blood plasma of patients with ALL and controls in the hope of comparing the effect of different genotypes of rs1800468 and rs1800469 polymorphisms in cytokine's concentration. However, it revealed that there were no differences in plasma TGFB1 concentration. Considering data dispersion of TGFB1 plasma levels in both groups, therefore, it is unclear whether these polymorphisms have actually functional roles in TGFB1 plasma expression, and it is difficult to draw any meaningful conclusion.

From another perspective, patients with ALL presented significantly lower TGFB1 plasma levels in comparison to controls. These results are in accordance to the findings of Chen *et al.* (1998), who shown that serum TGFB1 levels were significantly decreased in acute leukemia patients, restored to normal in patients who achieved complete remission, and tended to decrease again in patients who develop recurrence. Conversely to our results, Al-Mowallad *et al.* (2006) demonstrated that

although CD105 and TGFB3 plasma levels were significantly increased and decreased in patients with ALL compared to controls, respectively, no significant difference in TGFB1 plasma levels was shown between patients with ALL at diagnosis and controls.

The cytokine system constitutes a functional network in physiological and pathological conditions, and alterations in this setting may affect direct or indirectly leukemogenesis through altered functions of bone marrow stromal elements (Horacek *et al.*, 2013). In this context, TGFB is an essential regulator of cellular processes, including proliferation, differentiation, migration and cell survival (Dong and Blobel, 2006), and is perhaps the most potent endogenous negative regulator of hematopoiesis (Dosen-Dahl *et al.*, 2008).

It is known that tumor cells are often resistant to signals that inhibit growth of their normal cell counterparts. Escape from such control mechanisms may contribute to malignant transformation (Lotz *et al.*, 1994). Thus, we suggest that downregulation of TGFB1 expression observed in plasma patients with ALL might result in unlimited proliferation of malignant cells, which in turn may contribute to the bone marrow hyperplasia and peripheral blood invasion of leukemic clones.

With the aim of demonstrating the role of chemotherapy on TGFB1 plasma levels, samples were grouped according to therapeutic regimen at the time of sampling and the analysis revealed important differences, in the main, a reestablishment of TGFB1 plasma levels in patients with ALL during treatment. As a hematological malignancy, basic therapeutic agents used in the treatment of ALL are cytotoxic drugs with immunosuppressive effects, which requires monitoring of the immune system following cessation of therapy (Mazur *et al.*, 2004).

Indeed, our results demonstrated lower TGFB1 levels in patients before chemotherapy compared to treatment and remission group. Notwithstanding, mean plasma concentration of TGFB1 during remission was comparable to controls. This variation may reflect the immune status of the patient, the chemotherapy response and/or the *TGFB1* gene and protein regulation *per se*.

The *SKI* gene encodes the nuclear protooncogene protein homolog of avian sarcoma viral oncogene (Stavnezer *et al.*, 1981), and is expressed in both T and B mature murine hematopoietic lineage cells (Pearson-White *et al.*, 1995). One of its function is to interact with SMAD proteins family and represses the ability of the

SMADs to mediate TGFB-induced growth arrest and transcriptional activation (Luo *et al.*, 1999).

Moreover, the oncoprotein Evi-1 has been shown to bind with Smad3 and inhibit the activation of TGFB responsive promoters by disrupting the binding of Smad3-Smad4 complex to DNA (Kurokawa *et al.*, 1998). Transforming growth-interacting factor (TGIF) is another oncoprotein that can interact with TGFB-activated SMADs and represses expression of TGFB target genes (Wotton *et al.*, 2001).

Recently, Musashi-2 (Msi2) protein has been shown as an important regulator of hematopoietic stem cells, which controls cell fate, lineage bias and TGFB signaling in knockout mice (Park *et al.*, 2014), but also in human leukemic cells (Ito *et al.*, 2010; Kharas *et al.*, 2010). In a specific way, high expression of *MSI2* gene has been detected in patients with B-ALL when compared to the control group (Mu *et al.*, 2013; Aly and Ghazy, 2015), and it was considered an independent prognostic factor for patients with ALL.

Altogether, despite the fact that none of these negative TGFB regulators were investigated in this study, our results strengthened the hypothesis that downstream effects of TGFB signaling cascade are altered in ALL, since TGFB1 plasma levels are decreased at diagnosis.

In summary, our study evidenced the effects of a deregulated immune function in childhood ALL concerning to TGFB1 when predicting prognosis. It is not known exactly which gene or protein is repressing TGFB1 production in ALL at diagnosis. Nonetheless, further molecular and functional investigations are necessary to determine whether the association of TGFB1 plasma levels may also be influenced by other polymorphisms in its gene and structural haplotypes. Finally, in addition to the potential molecular influence of TGFB1 repressors, the results of this study may also indicate a significant impact of chemotherapy on TGFB1 levels. This could be of particular relevance in leukemia pathophysiology, highlighting the importance of evaluating the molecular mechanisms of certain drugs at restoring TGFB1 levels during patients with ALL's treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária do Paraná, Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI), Fundo Estadual para a Infância e

Adolescência (FIA/PR), Secretaria da Família e Desenvolvimento Social (SEDS) and Pro-reitoria de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina (PROPPG-UEL).

REFERENCES

AL-MOWALLAD, A. et al. Plasma CD105, TGFbeta-1, TGFbeta-3 and the ligand/receptor complexes in children with acute lymphoblastic leukaemia. **Anticancer Res**, v. 26, n. 1B, p. 543-547, 2006.

ALBERT, P. R. What is a functional genetic polymorphism? Defining classes of functionality. **J Psychiatry Neurosci**, v. 36, n. 6, p. 363-365, 2011.

ALY, R. M.; GHAZY, H. F. Prognostic significance of MSI2 predicts unfavorable outcome in adult B-acute lymphoblastic leukemia. **Int J Lab Hematol**, v. 37, n. 2, p. 272-278, 2015.

BLANK, U.; KARLSSON, S. TGF-beta signaling in the control of hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 125, n. 23, p. 3542-3550, 2015.

CHEN, Y.; LU, L.; WANG, L. [Study on gene expression of TGF beta 1 and its receptor in leukemia cells and the serum TGF beta 1 level in the patients with acute leukemia]. **Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi**, v. 19, n. 11, p. 576-580, 1998.

DAI, L. et al. A case-control study of childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms in the TGF-beta and receptor genes. **Pediatr Blood Cancer**, v. 52, n. 7, p. 819-823, 2009.

DONG, M.; BLOBE, G. C. Role of transforming growth factor-beta in hematologic malignancies. **Blood**, v. 107, n. 12, p. 4589-4596, 2006.

DOSEN-DAHL, G. et al. Bone marrow stroma cells regulate TIEG1 expression in acute lymphoblastic leukemia cells: role of TGFbeta/BMP-6 and TIEG1 in chemotherapy escape. **Int J Cancer**, v. 123, n. 12, p. 2759-2766, 2008.

EL-CHENNAWI, F. A. et al. Immune reconstitution during maintenance therapy in children with acute lymphoblastic leukemia, relation to co-existing infection. **Hematology**, v. 13, n. 4, p. 203-209, 2008.

GAJEWSKI, T. F. et al. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. **Nat Immunol**, v. 14, n. 10, p. 1014-1022, 2013.

GRAINGER, D. J. et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. **Hum Mol Genet**, v. 8, n. 1, p. 93-97, 1999.

HEALY, J. et al. No evidence for association between TGFB1 promoter SNPs and the risk of childhood pre-B acute lymphoblastic leukemia among French Canadians. **Haematologica**, v. 94, n. 7, p. 1034-1035, 2009.

HORACEK, J. M. et al. Evaluation of serum levels of multiple cytokines and adhesion molecules in patients with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia using biochip array technology. **Exp Oncol**, v. 35, n.3, p. 229-230, 2013.

INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v. 381, n. 9881, p. 1943-1955, 2013.

INCA. Estimate/2016 - Cancer Incidence in Brazil. p. 122, 2015.

Ito, T. et al. Regulation of myeloid leukaemia by the cell-fate determinant Musashi. **Nature**, v. 466, n. 7307, p. 765-768, 2010.

JIN, Q., et al. Polymorphisms and haplotype structures in genes for transforming growth factor beta1 and its receptors in familial and unselected breast cancers. **Int J Cancer**, v. 112, n. 1, p. 94-99, 2004.

JOHNSTON, C. J. et al. TGF-beta in tolerance, development and regulation of immunity. **Cell Immunol**, v. 299, p.14-22, 2016.

KARLSSON, G. et al. Smad4 is critical for self-renewal of hematopoietic stem cells. **J Exp Med**, v. 204, n. 3, p. 467-474, 2007.

KERKAR, S. P.; RESTIFO, N. P. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. **Cancer Res**, v. 72, n. 13, p. 3125-3130, 2012.

KHARAS, M. G. et al. Musashi-2 regulates normal hematopoiesis and promotes aggressive myeloid leukemia. **Nat Med**, v. 16, n. 8, p. 903-908, 2010.

KIM, S. J.; LETTERIO, J. Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis. **Leukemia**, v. 17, n. 9, p. 1731-1737, 2003.

KNAUS, P. I. et al. A dominant inhibitory mutant of the type II transforming growth factor beta receptor in the malignant progression of a cutaneous T-cell lymphoma. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 7, p. 3480-3489, 1996.

KUROKAWA, M. et al. The oncoprotein Evi-1 represses TGF-beta signalling by inhibiting Smad3. **Nature**, v. 394, n. 6688, p. 92-6, 1998.

LOTZ, M.; RANHEIM, E.; KIPPS, TJ. Transforming growth factor beta as endogenous growth inhibitor of chronic lymphocytic leukemia B cells. **J Exp Med**, v. 179, n. 3, p. 999-1004, 1994.

- LUO, K. et al. The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF β signaling. **Genes & development**, v. 13, n. 17, p. 2196-2206, 1999.
- MAZUR, B. et al. Concentration of IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-alpha in children with acute lymphoblastic leukemia after cessation of chemotherapy. **Hematol Oncol**, v. 22, n. 1, p. 27-34, 2004.
- MU, Q. et al. High expression of Musashi-2 indicates poor prognosis in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Res**, v. 37, n. 8, p. 922-927, 2013.
- PARK, S. M. et al. Musashi-2 controls cell fate, lineage bias, and TGF-beta signaling in HSCs. **J Exp Med**, v. 211, n. 1, p. 71-87, 2014.
- PEARSON-WHITE, S. et al. The ski/sno protooncogene family in hematopoietic development. **Blood**, v. 86, n. 6, p. 2146-2155, 1995.
- PICKUP, M.; NOVITSKIY, S.; MOSES, H. L. The roles of TGFbeta in the tumour microenvironment. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 11, p. 788-799, 2013.
- SCHIEMANN, W. P. et al. A deletion in the gene for transforming growth factor beta type I receptor abolishes growth regulation by transforming growth factor beta in a cutaneous T-cell lymphoma. **Blood**, v. 94, n. 8, p. 2854-2861, 1999.
- SHAH, R.; HURLEY, C. K.; POSCH, P. E. A molecular mechanism for the differential regulation of TGF-beta1 expression due to the common SNP -509C-T (c. -1347C > T). **Hum Genet**, v. 120, n. 4, p. 461-469, 2006.
- SHI, Y.; MASSAGUE, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 685-700, 2003.
- SILVERMAN, E. S. et al. Transforming growth factor-beta1 promoter polymorphism C-509T is associated with asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 169, n. 2, p. 214-219, 2004.
- STAVNEZER, E. et al. Generation of transforming viruses in cultures of chicken fibroblasts infected with an avian leukosis virus. **J Virol**, v. 39, n. 3, p. 920-934, 1981.
- VAIDYA, A.; KALE, V. P. TGF-beta signaling and its role in the regulation of hematopoietic stem cells. **Syst Synth Biol**, v. 9, n. 1-2, p. 1-10, 2015.
- WOLFRAIM, L. A. et al. Loss of Smad3 in acute T-cell lymphoblastic leukemia. **N Engl J Med**, v. 351, n. 6, p. 552-559, 2004.
- WOTTON, D. et al. The Smad transcriptional corepressor TGIF recruits mSin3. **Cell growth and differentiation**, v. 12, n. 9, p. 457-463, 2001.

5 CONCLUSÕES

- Não foi observada associação genotípica e alélica entre os polimorfismos rs1800468 e rs1800469 do *TGFB1*, tanto na susceptibilidade, quanto ao risco de recidiva de LLA;
- Não houve associação ao comparar os polimorfismos rs1800468 e rs1800469 do *TGFB1* com os níveis plasmáticos de TGFB1, indicando que, os polimorfismos genéticos não modificam a concentração plasmática da citocina;
- Os níveis plasmáticos de TGFB1 foram estatisticamente diferentes entre os grupos LLA e controle, sendo que na LLA os níveis eram menores que no controle;
- Além disso, houve diferença estatística nos níveis plasmáticos de TGFB1 em fases clínicas distintas, inferindo provavelmente que, a quimioterapia esteja modulando a produção desta citocina.

ANEXOS

ANEXO A

Aprovação do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos da
Universidade Estadual de Londrina

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 5231

Parecer CEP/UEL:	189/2013
CAAE:	17123113.4.0000.5231
Data da Relatoria:	30/09/2013
Pesquisador(a):	Maria Angelica Ehara Watanabe
Unidade/Órgão:	Programa de PG em Patologia Experimental

Prezado(a) Senhor(a):


O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

"Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer."

Situação do Projeto: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL, via Plataforma Brasil, relatório final da pesquisa.

Londrina, 30 de setembro de 2013.


Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
 Universidade Estadual de Londrina



ANEXO B



UNIVERSIDADE ETADUAL DE LONDRINA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Informações sobre a pesquisa:**

Você está sendo convidada (o) a participar, como voluntária (o), da pesquisa intitulada “**Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer**”, que tem por objetivo analisar determinados tipos de moléculas que podem influenciar na imunidade da paciente. Você será esclarecida (o) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Sua participação não é obrigatória e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que isso acarrete qualquer penalidade.

Procedimentos do Estudo:

Os procedimentos da pesquisa envolvem a obtenção de 5mL de sangue periférico para análise das células e moléculas do sistema imunológico.

Confidencialidade da Pesquisa

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

A amostra de sangue obtidos será utilizada para obtenção de DNA e RNA para a realização deste projeto. A participação no estudo não acarretará custos para você e não haverá nenhuma compensação financeira adicional. A coordenadora do projeto é a Prof^a. Dr^a Maria Angelica Ehara Watanabe, que pode ser encontrada no endereço: Rod. Celso Garcia Cid, 445, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Tel / Fax: (43) 3371-5629, como também procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371 – 2490.

Pesquisador Responsável _____

RG:: _____

Consentimento livre esclarecido e informado:

Eu, _____, RG _____, declaro que estou de acordo com as informações contidas neste documento, fui devidamente esclarecido pelo(s) pesquisador (es) dos objetivos e procedimentos da pesquisa de maneira clara e detalhada, e esclareci minhas dúvidas. Concordo em participar voluntariamente desse estudo permitindo a coleta do sangue do meu filho (a), sendo que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos no meu atendimento neste projeto.

Londrina, ____ de _____, 20 ____.

Assinatura do responsável (ou representante legal): _____

ANEXO B



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Informações sobre a pesquisa:

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa intitulada **“Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer”**, que tem por objetivo analisar determinados tipos de moléculas que podem influenciar na imunidade do indivíduo. Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Sua participação não é obrigatória e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que isso acarrete qualquer penalidade.

*** Sua participação será no grupo controle, ou seja, grupo de indivíduos saudáveis livres de qualquer neoplasia.

Procedimentos do Estudo:

Os procedimentos da pesquisa envolvem a obtenção de aproximadamente 5mL de sangue periférico para análise das células e moléculas do sistema imunológico.

Confidencialidade da Pesquisa

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

As amostras contendo as células serão utilizadas para obtenção de DNA e RNA para a realização deste projeto. A participação no estudo não acarretará custos para você e não haverá nenhuma compensação financeira adicional. A coordenadora do projeto é a Prof^ª. Dr^ª Maria Angelica Ehara Watanabe, que pode ser encontrada no endereço: Rod. Celso Garcia Cid, 445, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, telefone (43) 3371-5629, como também procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone (43) 3371-2490.

Pesquisador Responsável: _____ **RG:** _____

Consentimento livre esclarecido e informado:

Eu, _____, RG _____, declaro que estou de acordo com as informações contidas neste documento, fui devidamente esclarecido pelo(s) pesquisador(es) dos objetivos e procedimentos da pesquisa de maneira clara e detalhada, e esclareci minhas dúvidas. Concordo em permitir a participação voluntaria nesse estudo, permitindo a coleta de sangue periférico do meu **filho(a)** sendo que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos no meu atendimento neste projeto.

Londrina, ____ de _____, 20 ____.

Assinatura do doador (ou responsável): _____